

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DISTRIBUTION SAISONNIÈRE ET SPATIALE DE L'ABONDANCE ET DE LA TAILLE
DES BACTÉRIES AÉROBIQUES ANOXYGÉNIQUES PHOTOTROPHIQUES (AAPB)
DANS LES LACS BORÉAUX ET TEMPÉRÉS DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
LISA FAUTEUX

NOVEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce mémoire dépasse, pour moi, le cadre universitaire, car le travail duquel il est issu a changé ma vie. Je veux donc remercier mon directeur, Paul del Giorgio, d'avoir allumé une étincelle en moi lorsqu'il m'a proposé ce projet, et de m'avoir toujours appuyé et si généreusement transmis non seulement le savoir mais la passion. Une passion qui existe aussi parce que j'ai la chance d'être entourée de personnes extraordinaires. Enfin, le tout n'aurait pu se faire sans le soutien continu du groupe extraordinaire que forment les gens du Gril-Uqam, la communauté d'écologistes du deuxième étage, la compréhension de Ginette Lauzeau et la générosité de Matt Cottrell, de David Kirchman. Merci.

Aux Fontaine-Guérard un merci particulier; vous serez toujours présents dans mes pensées. Louis merci pour les beaux moments, au-delà de tout, ce sont eux qui restent.

Papa et Maman, je vous aime beaucoup. Janie et Alain je suis une sœur comblée. Merci aussi à Catherine Bauchemin, Alice Parkes, Annick St-Pierre, Jérôme Comte, François Guillemette, Marie-Ève Ferland, Jean-François Lapierre, Raphael Lami, Véronique, Dominic, Maria, Soren, Caroline, Leila, Jonathan, Vanessa, Katrina, Tiffany, Hugo, Vincent, Francis, vous êtes merveilleux.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire bilingue comprend d'abord un résumé et une introduction en français. Cette dernière présente la synthèse d'une revue exhaustive de la littérature scientifique pertinente, qui nous a permis de focaliser nos efforts sur les questions non résolues. La section qui est présentée ensuite est le manuscrit de l'article. Celui-ci est écrit en anglais et est le résultat de la prise de données effectuée au cours de cette maîtrise de juillet 2007 à octobre 2008. Cette collect de données est le fruit d'un échantillonnage de grande envergure réalisé au cours d'une année dans trois régions du Québec. Pour accomplir ce travail, j'ai bénéficié de l'aide de Marilou Bergevin, de Véronique Ducharme-Riel, Annick St-Pierre et de Delphine Marchand. Enfin, la dernière section, aussi rédigée en français, fait office de conclusion générale du mémoire. La rédaction ainsi que les analyses qui lui ont été nécessaires ont été réalisées grâce à la collaboration généreuse de mon directeur de maîtrise, Dr Paul del Giorgio. De plus, j'ai bénéficié de l'aide de François Guillemet sur le plan des statistiques. Enfin, l'article sera soumis sous peu à la revue scientifique *Environmental Microbiology*.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
RÉSUMÉ	viii
 CHAPITRE I	 vi
INTRODUCTION	1
LES CARACTÉRISTIQUES FONDAMENTALES DES AAPB	3
LA LUMIÈRE COMME SOURCE D'ÉNERGIE ALTERNATIVE	3
LA RÉGULATION DE LEUR MÉTABOLISME	4
ÉCOLOGIE, DIVERSITÉ ET DISTRIBUTION DES AAPB	6
LA DIVERSITÉ	6
L'ABONDANCE DES AAPB : LEUR DISTRIBUTION SPATIALE	9
L'ABONDANCE DES AAPB : DES PATRONS SAISONNIERS	10
L'IMPACT ÉCOLOGIQUES DES AAPB	11
 CHAPITRE II	
TEMPORAL AND SPATIAL PATTERNS IN ABUNDANCE AND CELL SIZE OF AEROBIC ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIA (AAPB) IN TEMPERATE AND BOREAL LAKES	13
SUMMARY	14
INTRODUCTION	15
RESULTS	17
MAGNITUDE OF AAPB ABUNDANCE, SIZE AND BIOVOLUME	18
TEMPORAL VARIABILITY : DAILY PATTERNS	19
TEMPORAL VARIABILITY : SEASONAL PATTERNS	19
SPATIAL VARIABILITY : VERTICAL WATER COLUMN VARIATION	20
SPATIAL VARIABILITY : ALONG LAKE GRADIENTS PATTERNS	21
DISCUSSION	22
TEMPORAL DYNAMICS	24
RELATIONSHIP TO TEMPERATURE AND LIGHT	24
PATTERNS IN CELL SIZE AND ABUNDANCE ALONG ENVIRONMENTAL GRADIENTS	26
ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF AAPB	28
TOP DOWN REGULATION AND ECOLOGICAL IMPLICATIONS	29

EXPERIMENTAL PROCEDURES	31
SITES AND SAMPLING	31
CHEMICAL ANALYSIS	32
ABUNDANCE AND SIZE OF AAPB	32
STATISTICAL ANALYSIS	33
AKNOWLEDGMENTS	34
TABLES	35
FIGURES LEGENDS	38
FIGURES	39
CONCLUSION	46
BIBLIOGRAPHIE	50

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
Fig I. Schéma Conceptuel de la classification des AAPB au sein de l'ensemble des bactéries et des particularités du métabolisme phototrophe.	5
Fig. 1. Sampling Area. Lakes were sampled within three regions;(A) the Laurentians (LAU; 45°59'N, 74°01'W), (B) the Eastern-Townships (EST; 45°24'N 72°12'W) and (C) Boreal (BOR 52°14'N 75°W). All samples were collected between July 2007 and October 2008. <i>This map was reproduced with the permission of Natural Resources Canada 2010, from The Atlas of Canada.</i>	39
Fig 2. Relationship of AAPB to total community abundance (a; Eqn 1, Table 2), cell size (b; Eqn. 2, Table 2) and biovolume (c; Eqn 3, Table 2). All presented on log scales. Samples are from July 2007 to October 2008.	40
Fig 3. Daily variation of abundance (a) and cell size (b), of total bacteria (triangles), AAPB (circles) and AAPB proportion (solid circles). Error bars were put only on first and last samples for visual clarity. Dark rectangles at the top of panels represent the night period. Sampling was done in lake Croche from the 22nd to the 25th of July 2008.	41
Fig. 4. Broad seasonal trends in AAPB relative abundance and biovolume (a) as well as in average cell size compared to total prokaryote averages (b). Each average is made of 117 samples made in the three regions. Stars indicate where seasonal average are significantly different ($p < 0.05$).	42
Fig. 5. Relationship of %AAPB (a) and average cell size (b) to water temperature. Each point represents monthly averages, solid circles are AAP values and triangles represent total community average, except for the month of October where the sample from lake Croche with an exceptionally high (37%) values was eliminated (see text for further details). Error bars represent the standard error on mean.	43
Fig. 6. Water column distribution of %AAPB (pink circle), Chl <i>a</i> (green diamond) and abundance of total community (triangles) and AAPB (circles). The average values of epilimnion, metalimnion and hypolimnion were obtained from July 2008 samples in four lakes (Bowker, Bran-de-Scie, Connelly and Croche). Error bars represent the standard error on mean.	44
Fig 7. Relationship of total bacteria abundance (triangles) and AAPB abundance (circles) to DOC (a) and Chl <i>a</i> (b). In (c) %AAPB is presented as a function of DOC : Chl <i>a</i> ratio. Green markers represent 4 eutrophic lakes that were excluded from relationship in panel (c) Data is presented on log scales. All 38 lakes were sampled in mid-summer 2008.	45

LISTE DES TABLEAUX

Tables	Pages
Table I. Résumé des données sur l'abondance <i>in situ</i> des AAPB	10
Table 1. Summary of Environmental Conditions (summer 2008 data)	35
Table 2. Regression models between key variables	36
Table 3. Regression models between key variables (summer 2008 data)	37

RÉSUMÉ

Les bactéries aquatiques tiennent des rôles clés dans les écosystèmes aquatiques, notamment au niveau des flux de carbone et d'énergie, malgré le fait que plusieurs exemples de mixotrophie aient été répertoriés elles demeurent largement divisées en deux groupes; soit les hétérotrophes et les autotrophes. Cependant les bactéries aérobiques anoxygéniques phototrophiques (AAPB) possèdent en plus de leur métabolisme hétérotrophe un système phototrophique, basé sur la bactériochlorophyll *a* (BChl *a*) leur permettant d'obtenir un supplément d'énergie considérable. Ce groupe de bactéries, qui génère de plus en plus d'intérêt dans les milieux marins, n'a que très peu été étudié en eaux douces. Pour pallier ce manque nous avons conduit une étude biogéographique comparant l'abondance et la taille des AAPB dans 43 lacs situés dans deux régions tempérées (Cantons de l'Est et Laurentides) et une région Boréal (Eastmain), durant le cours d'une année. Les AAPB étaient présentes non seulement dans tous les lacs, mais aussi durant toute l'année et ce malgré les conditions adverses de l'hiver. L'abondance relative variait entre >1% et 37%, avec une moyenne de 6%, mais étant donnée qu'elles avaient en moyenne le double de la taille des autres bactéries, leur biomasse relative moyenne est de 10%. L'abondance, bien qu'elle suive les patrons généraux de l'ensemble de la communauté, chute durant l'hiver et est très dynamique à courte échelle ce qui indique que plusieurs facteurs de régulations pourraient agir en même temps. Nos données ne supportent pas l'hypothèse voulant que la photohétérotrophie soit avantageuse dans les milieux oligotrophes, plutôt l'abondance est positivement corrélée au carbone organique dissout. De plus, il semble que ce soit la qualité et non seulement la quantité, qui influe sur l'abondance des AAPB; ainsi il semble que leur abondance est maximale dans les milieux à forte teneur en DOC et aussi peu de chlorophylle. Or nous proposons que la photohétérotrophie pourrait agir de façon analogue au co-métabolisme en fournissant une amorce énergétique permettant d'exploiter des sources de carbones récalcitrantes.

Mots clés : Bactérie aérobique anoxygénique phototrophique, bactériochlorophylle a, écologie aquatique, flux d'énergie, biogéographie.

INTRODUCTION

Découvertes il y a 30 ans dans la baie de Tokyo (Shiba *et al.* 1979), les bactéries aérobiques anoxygéniques phototrophiques (AAPB) ont longtemps été considérées comme marginales occupant une petite niche écologique. Pendant plusieurs années, les AAPB étaient isolées de différents milieux plutôt particuliers (tapis microbiens, source thermale, lacs hypersalins) et étaient décrites comme des organohétérotrophes, possédant aussi de la bactériochlorophylle *a* (BChl *a*); un pigment photosynthétique trouvé chez les bactéries pourpres, mais jusque-là associé strictement aux milieux anaérobiques (Yurkov & Beatty, 1998). Les AAPB sont donc mixotrophes dites photohétérotrophes, c'est-à-dire qu'en plus du métabolisme hétérotrophe, la BChl *a* permet d'utiliser l'énergie des photons comme une source alternative d'énergie. Or ce n'est que depuis l'année 2000 qu'elles ont commencé à faire l'objet d'études systémiques, lorsqu'on a découvert qu'elles pouvaient être responsables de 2 à 5 % du transport photosynthétique d'électrons à la surface des océans (Kolber *et al.* 2000). Cette étude a changé l'ampleur et l'orientation des travaux dont les AAPB font l'objet, car elle a établi leur pertinence écologique (Eiler 2006). Traditionnellement, les microorganismes aquatiques étaient divisés en deux catégories: les hétérotrophes, qui consomment la matière organique, et les autotrophes, capables de fixer du carbone inorganique et de produire de l'énergie. Or, en réalité, il existe une myriade de stratégies métaboliques entre ces deux pôles (Moran & Miller 2007), et les AAPB, grâce à leur capacité phototrophique (Yurkov & Beatty 1998) et leur potentiel d'activité élevé (Koblizek *et al.*, 2005), constituent une source non comptabilisée d'énergie dans les systèmes aquatiques, qui pourrait avoir beaucoup d'impact sur la façon dont on comptabilise les flux d'énergie et de carbone (Gasol *et al.*, 2008).

Les premières études utilisant les approches traditionnelles de microbiologie (cultures) ont généré une importante somme de connaissances sur les caractéristiques fondamentales de ces mixotrophes, particulièrement en ce qui a trait au métabolisme et aux facteurs qui le régule (Breznak *et al.*, 1978, Haraishi *et al.*, 1978, Suyama *et al.*, 2002). Par la suite, leur abondance *in situ* a pu être mesuré par

fluorométrie (Kolber *et al.*, 2000) ou par microscopie (Sieracki *et al.*, 2006), car la BChl *a* émet spécifiquement dans l'infrarouge lorsqu'elle est excitée. Finalement, les récentes avancées en biologie moléculaire ont permis d'étudier plus spécifiquement la diversité génétique ainsi que la distribution de ce groupe de bactéries (Béjå *et al.* 2002). Ainsi, les AAPB font l'objet d'un effort de recherche important, mais mené presque exclusivement dans les milieux marins. Ainsi très peu d'études se sont concentrées sur les milieux dulcicoles bien que nous savons qu'elles sont présentes (Karr *et al.*, 2003, Page *et al.*, 2004, Waidner & Kirchman 2005). Plus récemment, Masin *et al.* (2008) ont quantifié l'abondance dans 12 lacs européens, établissant que la présence des AAPB pouvait être importante surtout dans les systèmes peu productifs. Par contre l'étude de la présence des gènes de synthèse de la BChl *a* de Eiler *et al.* (2009) menée dans une vingtaine de lac propose au contraire que la présence dans les milieux riches en carbone est plus importante que dans les milieux plus oligotrophes. Ainsi, l'étude des AAPB dans les lacs est encore fragmentaire. Or, grâce à notre projet de recherche, nous visons d'abord à contribuer à pallier cette lacune ; ensuite, en profitant des conditions particulières que nous offre le système lacustre québécois, large spectre de conditions environnementales avec de fortes variations saisonnières, nous souhaitons contribuer à l'avancement de la recherche sur l'écologie fondamentale des AAPB, qui est encore irrésolue.

Afin de bien comprendre la portée écologique des AAPB, il est primordial de bien comprendre la physiologie et le métabolisme de base. En juxtaposant ces données aux premiers patrons de distributions qui émergent de la littérature, il sera éventuellement possible de déterminer si il existe une niche écologique pour ces organismes, ou simplement est-ce que la photohétérotrophie un trait métabolique commun chez plusieurs organismes mais sans pertinence quant à leur rôle écologique. Enfin cette revue de littérature est aussi essentielle pour focaliser les questions pertinentes encore à résoudre.

Les caractéristiques fondamentales des AAPB

La connaissance des aspects fondamentaux concernant la physiologie et le métabolisme est importante pour comprendre le rôle potentiel des AAPB ainsi que les variables clés pouvant influencer leur distribution. Les AAPB font toute partie de la division des Protéobactérie et se trouvent toutes en milieu oxygéné. Elles ont été identifiées dans une variété d'habitats et de conditions environnementales (température, salinité, pH, O₂); ce qui indique qu'elles sont très répandues, bien qu'aucun patron de distribution cohérent n'a été identifié (Yurkov & Beatty, 1998; Eiler, 2006). Elles sont caractérisées par la présence de BChl *a*. Ce pigment supporte aussi la phototrophie chez d'autres organismes tels les bactéries pourpres (anaérobiques). Cependant la présence de ce pigment chez des bactéries aérobiques est une nouveauté (Shiba *et al.*, 1979). De plus, les AAPB possèdent une variété de caroténoïdes qui, pour la plupart, assurent un rôle de photoprotection (Du *et al.*, 2006) et donnent une coloration orange-rose aux cellules. Tous les gènes de synthèse et de régulation de l'appareil phototrophique des AAPB sont regroupés en un super-opéron, nommé *puf*, contenant approximativement 45-50 K paires de bases (Waidner & Kirchman, 2005).

La lumière comme source d'énergie alternative

L'appareil phototrophique est composé d'un centre de réaction (RC) formé de deux sous-unités (dont les gènes *puf M* et *puf L* servent à l'identification génétique) et d'une antenne LH I liés à la BChl *a*, mais les AAPB ne possèdent pas de LH II (Kolber *et al.*, 2001; Koblizec *et al.*, 2003) présent chez la majorité des autophototrophes. De plus, elles sont dites anoxygéniques phototrophiques, car elles ne font pas de photosynthèse; elles ne produisent donc pas d'oxygène et ne fixent pas de façon importante de CO₂, puisque qu'elles ne possèdent pas l'enzyme RubisCO (Yurkova, 2006). Leur appareil phototrophique est néanmoins fonctionnel (Suyama *et al.*, 2002) et permet la production d'ATP par la photophosphorylation d'adénosine triphosphate (Okamura *et al.*, 1986; Hanada *et al.*, 1997). Par conséquent, ces bactéries sont des hétérotrophes obligés (Yurkov & Beatty, 1998) et la

lumière leur sert de supplément métabolique (Beatty, 2002). Typiquement un RC contient 200 molécules de Chl *a*, mais chez les AAPB le contenu en BChl *a* se situe plutôt à environ 36 molécules (Kolber *et al.*, 2001; Koblizec *et al.*, 2003). Or, leur potentiel énergétique est inférieur à celui des autophototrophes, mais tout de même important : on estime que le métabolisme phototrophique des AAPB permettrait de générer 540 molécules d'ATP par seconde (Koblizec *et al.*, 2003) ou jusqu'à 20 % des besoins cellulaires (Kolber *et al.*, 2001). Cela représente un avantage important quand les ressources sont rares. Par exemple, avant même que les AAPB soient considérées comme un groupe fonctionnel, une expérience démontrait que les cellules d'une culture de *Rhodospirillum rubrum*, placées en condition de famine, ont un temps de demi-vie de survie de 3 jours en l'absence de lumière, qui passe à 14 jours en présence de lumière (Breznak *et al.*, 1978 ; voir aussi Hiraishi *et al.*, 2000). La compréhension des circonstances où elles expriment leur habileté phototrophique est donc un enjeu majeur dans l'évaluation de leur rôle écologique.

La régulation de leur métabolisme

La régulation de l'appareil phototrophique des AAPB n'est pas encore élucidée. Elle peut être évaluée soit par la production de pigments (Bchl *a*) soit par la transcription des gènes *puf*, et les deux peuvent être affectés par la lumière, l'oxygène et la matière organique. De façon générale, la lumière inhibe la synthèse de BChl *a* (Shiba *et al.*, 1979; Yurkov & Beatty, 1998) qui n'est observée qu'après quelques heures d'obscurité (Koblizec *et al.*, 2005). Par contre, la lumière produit des effets plus variés sur l'expression de l'opéron *puf* (Nishimura *et al.* 1996; Suyama *et al.* 2002).

Le carbone affecte aussi la régulation; des isolats placés dans un milieu riche en nutriments peuvent cesser la synthèse de pigments, puis la reprendre après une diminution de ces derniers (Kolber *et al.*, 2001). Ce type de régulation peut être très dynamique : une expérience dans laquelle une culture de *R. depolymerans* était utilisée a montré qu'une réduction constante de nutriments n'entraînait pas la transcription de l'opéron *puf*, mais qu'un transfert dans un milieu dilué provoquait l'expression de l'appareil phototrophique (Suyama *et al.*, 2002). Ainsi, dans ce cas, ce n'est pas la concentration mais

l'amplitude du changement qui compte. De plus, il semble que cette réaction peut aussi être modifiée selon la source spécifique du carbone (Suyama *et al.*, 2002).

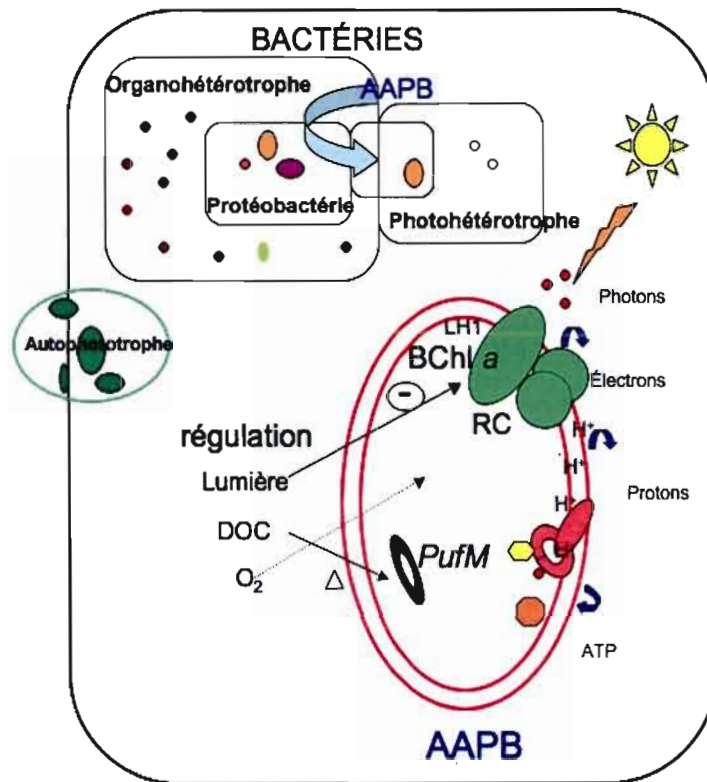


Figure I. Schéma Conceptuel de la classification des AAPB au sein de l'ensemble des bactéries et des particularités du métabolisme phototrophe. Tous les gènes qui codent pour ce dernier se retrouvent dans le super-opéron *puf* dont les mécanismes de régulation connus sont surtout relié au DOC. L'appareil photosynthétique est composé du LH1 (dont le pigment photosynthétique est la BChl *a*) et d'un centre de réaction formé de deux sous-unités (M et L) où les électrons générés, suite à la conversion des photons, passent par une série de réaction d'oxydoréduction qui produisent un gradients de protons, qui lui actionne la pompe où est produit l'ATP. L'appareil phototrophique est régulé par la lumière et le DOC. Finalement, l'oxygène semblerait plutôt agir sur la distribution des espèces.

En somme, d'après le schéma général de ce qui est connu de la régulation de la phototrophie chez les AAPB, il semble que celle-ci soit avantageuse dans les conditions de famine avec illumination transitoire, conditions trouvées à la surface des océans (Beatty, 2002). Selon une des hypothèses principales découlant des observations de Kolber *et al.* (2000), la capacité de phototrophie serait un avantage sur les bactéries strictement hétérotrophes dans les milieux peu productifs. Cependant, cette hypothèse se heurte à des observations contradictoires. Il est aussi possible que, étant donné la diversité du groupe des AAPB, la régulation ne soit pas la même pour toutes les espèces. Ainsi, une présence importante d'AAPB a été observée en milieu mésotrophe (Schwalbach & Fuhrman, 2005) et dans d'autres milieux productifs, comme les estuaires (Waidner & Kirchman, 2007), ce qui soulève la question de la pertinence de relier l'abondance au statut trophique (Lami *et al.*, 2007).

Écologie, diversité et distribution des AAPB

Aucun patron définitif ne permet de décrire la distribution des AAPB. Par contre, malgré le nombre encore relativement restreint d'étude il y a une évolution de la compréhension de leur distribution et certains patrons émergent de la littérature. Aujourd'hui, l'idée première selon laquelle les AAPB forment une classe uniforme et bien distribuée (Kolber *et al.*, 2001) est tranquillement remplacée par l'idée selon laquelle elles appartiennent à un groupe diversifié ayant une distribution spatialement et temporellement hétérogène (Béjà *et al.* 2002; Yutin *et al.*, 2007; Oz *et al.*, 2005; Waidner & Kirchman, 2008).

La diversité

La question de la diversité est particulièrement pertinente en ce qui a trait à l'évolution des AAPB et à l'origine de la phototrophie anoxygénique en milieu aérobique. Les deux premiers spécimens à avoir été isolés étaient issus de la baie de Tokyo (Harashima *et al.* 1978; Shiba *et al.*, 1979) ; il s'agissait d'*Erythrobacter longus* et de *Roseobacter denitrificans*. Ce sont encore les deux principaux genres

pour lesquels des cultures existent (Eiler, 2006). En 1998, Yurkov et Beatty relataient l'identification six genres supplémentaires, issus du milieu dulcicole (*Erythromicrobium*, *Roseococcus*, *Porphyrobacter*, *Acidiphilum*, *Erythromonas* et *Sandaracinobacter*), tous de la sous-classe des α -Protéobactérie. Six ans après, 12 autres genres étaient identifiés et cultivés (Rathgeber *et al.*, 2004). Les nouvelles techniques moléculaires ayant grandement augmenté la capacité à répertorier la diversité génétique, de nouveaux genres appartenant aux sous-classes β et γ sont maintenant connus (voir Page *et al.*, 2004, Rathgeber *et al.* 2004, Yutin *et al.* 2005).

Les principales méthodes employées aujourd'hui, la PCR ou l'analyse de bibliothèques de chromosomes bactériens clonés « bacterial artificial chromosomes (BAC) libraries » (Béja *et al.*, 2002; Yutin *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2006), et plus récemment aussi le séquençage et l'analyse direct d'ADN environnemental (Yutin *et al.*, 2007) ciblent le gène *pufM*, qui code pour la sous-unité M du centre de réaction (RC) ou les gènes de synthèse de la bactériochlorophyll *a*. Il semble que les β -Protéobactérie se trouvent surtout en eaux douces, alors que les α et γ dominent dans les milieux marins. Par ailleurs, d'autres sous-groupes ont été identifiés et trouvés seulement les eaux oligotrophes (Yutin *et al.*, 2007). Or il n'est plus question d'une distribution cosmopolite d'un petit groupe de genres bien établies (Kolber *et al.*, 2001), mais plutôt, les patrons de distribution de la diversité semblent indiquer que les AAPB sont bien ubiquistes, mais aussi localement adaptées. Il existe donc des preuves circonstanciées qui suggèrent que la diversité génétique des AAPB pourrait être reliée à des adaptations à des conditions environnementales particulières, telles que la concentration en oxygène et la luminosité. Par exemple, à l'intérieur d'un lac, on a trouvé une forte stratification de la diversité des AAPB en fonction de la profondeur, stratification absente chez les autres groupes de phototrophes (Karr *et al.*, 2003).

Les arbres phylogénétiques dérivés de la diversité de séquences des gènes AAPB servent à étudier l'évolution de ce groupe. Les phylogénies établies en se fondant sur les analyses de gènes de l'opéron *puf* ne concordent pas avec celles qui se basent sur le gène 16S du ribosome. Par exemple, le groupe des α -Protéobactérie se divise en quatre sous-groupes, dont deux se dispersent à travers des β et des γ -Protéobactérie (Béjà *et al.*, 2002; Oz *et al.*, 2005) cela indique que l'acquisition de ces gènes est fort probablement reliée à des épisodes des transfert latéral (Allgier *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2004). Ce qui implique qu'à l'intérieur du groupe, il existe des genres qui sont très peu similaires sur l'ensemble de leurs autres traits. Enfin, il reste à déterminer si les AAPB ont évolué sous les pressions de la sélection naturelle à partir d'un ancêtre phototrophe anaérobie ou à travers une modification de la régulation l'appareil phototrophique permettant d'obtenir un surplus d'énergie lorsque les nutriments sont en faible concentration (Beatty, 2002). Il est aussi possible que des bactéries non AAPB aient, au fil du temps, perdu leur capacité de phototrophie : en effet, selon les classifications basées sur le 16S, les AAPB se rapprochent parfois phylogénétiquement plus des membres non-phototrophiques (Beatty, 2002).

De plus, il existe certaines bactéries qui pourraient être considérées comme intermédiaires entre les deux groupes. Par exemple, elles possèdent des caroténoïdes, mais elles ne produisent pas de BChl *a* (Yurkov & Beatty 1998). Par ailleurs, à l'intérieur des Roséobactéries, certains genres possèdent les gènes *puf*, mais ne produisent pas de BChl *a* (Allgaier *et al.*, 2003). Ce qui soulève la question écologique suivante : quelles sont les conditions environnementales qui favorisent cette voie métabolique? Puisque pour l'instant nous ne sommes pas capables de répondre à cette question, il est toujours d'un intérêt fondamental de poursuivre les analyses de distribution et d'abondance, particulièrement en eaux douces où les manques à combler sont très importants.

L'abondance des AAPB : leur distribution spatiale

En 2000, Kolber *et al.*, établissaient l'importance des AAPB à la surface des océans. L'étude suivante estimait que la moyenne globale d'abondance relative des AAPB (par rapport à la communauté bactérienne totale) se situait entre 5 et 10 % ; elle a, de plus, contribué à établir l'idée que la photohétérotrophie était plus importante en milieux oligotrophes (Kolber *et al.*, 2001). Toutes les données sur l'abondance se situent entre 0,1 % (Goericke 2002) et 34 % (Waidner & Kirchman 2007), mais la majorité se situent en deçà de 15 % (voir tableau I). Cependant, il semble que le patron de distribution des AAPB soit plus complexe qu'initialement prévu. D'abord, leur proportion peut être très faible, sans liens avec la productivité du milieu (Goericke, 2002), suggérant une distribution non constante. Ensuite, d'autres études ont révélé que leur abondance relative pouvait aussi être supérieur dans les eaux productives (Schwalbach & Fuhrman 2005; Cottrell *et al.*, 2006; Zhang & Jiao 2007; Waidner & Kirchman 2007).

Enfin, l'existence d'une relation simple entre l'abondance et le statut trophique commence à être remise en question (Yutin *et al.*, 2007; Lami *et al.*, 2007), puisque les résultats des différentes études ne sont pas toujours cohérents. Il existe, néanmoins, une corrélation positive entre la concentration de BChl *a* (ou le % AAPB) et la concentration de Chl *a* (Sieracki *et al.*, 2006, Jiao *et al.*, 2007) qui est aussi visible verticalement le long de la colonne d'eau (Lamie *et al.*, 2007, Yutin *et al.* 2007, Zhang & Jiao 2007). Cette relation est expliquée comme étant dû à une utilisation similaire de la lumière en termes de longueur d'onde ou d'intensité (Cottrell *et al.*, 2006), mais certains auteurs suggèrent aussi que les AAPB pourrait exploiter l'exudat de carbone organique dissous très labile produit par les autophotorophes (Jiao *et al.*, 2007). Néanmoins, il est fort probable que la distribution des AAPB soit en lien cohérente avec leur phototrophie, puisque les AAPB ne sont présentes que dans la zone photique (Kolber *et al.*, 2001; Schwalbach & Furhman 2005; Cottrell *et al.*, 2006; Masin *et al.*, 2006).

Tableau I Résumé des données sur l'abondance <i>in situ</i> des AAPB			
Étude	Méthode*	% Prokaryotes	Région
Kolber 2000	IRFRR	2-5% (transport d'électrons)	Pacifique
Kolber 2001	EpMlc	Au moins 11% (moyenne) 5-10% (transport d'électrons)	Pacifique (NE)
Goericke 2002	HPLC	0.1-2%	Pacifique Côte Californie
Koblizec 2005	IRFRR	0.3-10 %	Baltique
Schwalbach 2005	HPLC EpMlc qPCR	0.12 - 0.65% 1.66% (moyenne) 10.7% (moyenne) 18.7% (moyenne)	Côte Californie Côte Californie Baie de Chesapeake Long Island
Masin 2006	EpMlc	1-12%	Baltique
Koblizec 2006	IRFRR	0.2% (moyenne)	Baltique
Sieracki 2006	EpMlc	1-9%	Atlantique (NE)
Cottrell 2006	EpMlc	2.3% (moyenne) 5-16%	Pacifique Atlantique
Lami 2007	EpMlc	1-24%	Pacifique (S)
Waidner 2007	EpMlc qPCR	12% (moyenne) 17% (moyenne) 34% (maximum)	Estuaires Delaware et Chesapeake
Jiao 2007	EpMic	3.7% (moyenne) 1.57% (moyenne) 1.09 % (moyenne)	Indien Atlantique Pacifique
Zhang 2007	EpMic	0.5-11.6%	Mer de Chine (E)
Masin 2008	EpMic / HPLC	<1-21%	Lac Europe central
Cottrell 2009	EpMic	5-8%	Arctique

*Abréviations : IRFRR (« infrared fast repetition rate fluometry »; mesure *in situ* à balayage rapide de la fluorescence infrarouge); EpMic (microscopie à épifluorescence); HPLC (chromatographie liquide à haute pression); qPCR (réaction quantitative de polymérase en chaîne).

L'abondance des AAPB : des patrons saisonniers

La relation entre les AAPB et la température n'est pas encore élucidée ; peu d'études ont abordé ce sujet. L'un des premiers cycles saisonniers détaillés indique que l'abondance dans la mer Baltique décline durant l'hiver et l'automne, et qu'elle est maximale (12 %) à la fin du printemps, immédiatement après le bloom des autophototrophes (Masin *et al.*, 2006). De même, dans un transect du nord-est de l'Atlantique, leur abondance a changé d'un facteur de quatre entre octobre et mars (Sieracki *et al.*, 2006). À une échelle plus globale, cependant, aucune différence n'a pu être détecté entre les eaux tropicales, tempérées et polaires, et aucune différence mensuelle n'a été détectée non plus dans les eaux de la côte californienne - où il faut dire que leur abondance est très faible (Schalbach & Furhman, 2005). Dans la mer de Chine, en termes absolus, leur abondance ne change pas; cependant, comparativement à la communauté totale, leur abondance relative est maximale durant l'hiver (Zhang

& Jiao, 2007). Ces divergences apparentes soulèvent un autre aspect qui émerge dans la littérature : l'abondance des AAPB, comme leur diversité, semble présenter une structure régionale plutôt que cosmopolite. Par exemple, il semble que, de façon générale, *Synechococcus* et *Prochlorococcus* surpassent en nombre les AAPB dans l'océan Pacifique, alors que, dans l'océan Atlantique, c'est l'inverse qui est observé (Cottrell *et al.*, 2006). Enfin, lorsqu'on combine ces deux échelles de variation (temps et l'espace) avec l'utilisation de différentes méthodes de mesure, on ne peut s'étonner de retrouver autant de divergence dans la littérature. C'est pourquoi il est important de considérer ces deux facteurs en plus de la variation environnementale pour pouvoir éclaircir les patrons de distribution des AAPB. Outre la température, deux variables environnementales seraient des régulateurs potentiels, soit le carbone organique dissous et la turbidité (Zhang & Jiao, 2007; Waidner & Kirchman, 2005).

L'impact écologique des AAPB

Bien que notre connaissance des AAPB soit encore très limitée, les études s'entendent pour dire que la photohétérotrophie pourrait grandement affecter notre façon d'évaluer les flux de carbone et d'énergie. En étant capables de produire de l'ATP par photophosphorylation, les AAPB peuvent augmenter le ratio de carbone assimilé par unité de carbone respiré, c'est-à-dire avoir une plus grande efficacité (Kolber *et al.*, 2001; Eiler, 2006). Par conséquent, les estimations de production bactérienne par unité de carbone organique dissous ou les estimations de l'efficacité de croissance bactérienne faites à partir des incubations à la noirceur sont potentiellement biaisées (et il faudrait les réviser à la hausse) (Eiler, 2006). Par ailleurs, nous savons que la lumière peut accroître l'assimilation d'acides aminés durant les mesures de production bactériennes (Michelou *et al.*, 2007). La production peut augmenter de 40 %, desquels 30 % ne sont pas expliqués par les picocyanobactéries ni par les picoeukaryotes. Ces auteurs pensent que l'augmentation pourrait être dû aux AAPB ou à un autre type de mixotrophes (bactéries contenant de la protéorhodopsine) (Michelou *et al.*, 2007). Ainsi, une meilleure compréhension de la mixotrophie pourrait mener à une réévaluation des flux du carbone et d'énergie dans les systèmes aquatiques, surtout si l'on tient compte du fait que les AAPB ont des taux de croissance plus rapides (Koblizec *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). De plus, puisque les AAPB ont la réputation d'avoir une taille supérieure à celle des autres bactéries hétérotrophes (Sieriacki *et al.*, 2006; Lami *et al.*, 2007), elles pourraient aussi être soumises à une plus grande pression de prédation, ce qui pourrait affecter grandement la boucle microbienne ainsi qu'expliquer le fait que l'abondance ne semble pas a posteriori présenter de patrons clairs au niveau de sa distribution. Enfin une des questions primordiales à laquelle il n'est toujours pas possible de répondre est celle de

comprendre le réel bilan énergétique de la photohétérotrophie; quel est le coût énergétique du métabolisme photohétérotrophe en relation avec son rendement? Aussi, est-ce qu'il y a un rôle plus précis à photohétérotrophie autre que celui de fournir un supplément énergétique? Finalement à la lumière de ces réponses, il sera important de se questionner sur la cohérence des AAPB comme groupe écologique fonctionnel.

In preparation for Environmental Microbiology

Temporal and spatial patterns in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB) abundance and cell size in temperate and boreal lakes.

Lisa Fauteux and Paul A. del Giorgio

Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie (GRIL), Dépt. des sciences biologiques,

Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec,

Canada H3C 3P8

fauteux.lisa@courrier.uqam.ca

and

Matthew T. Cottrell, David L. Kirchman

University of Delaware

School of Marine Science and Policy

700 Pilottown Rd. Lewes, DE 19958 US

Summary

There is now evidence that aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB), once thought to be restricted to very particular environments, are in fact widespread across aquatic systems, yet information on freshwaters is still sparse. We used infrared fluorescence microscopy to assess the abundance and cell size of AAPB in 43 lakes in temperate and boreal regions with large seasonal fluctuations. Abundance varied from 1.51 to 5.49×10^5 cells mL⁻¹, representing <1 to 37 % of total bacterial abundance, with some evidence for regional patterns in this distribution. AAPB were present year-round, including during the ice-cover period, but average proportion in abundance declined in winter relative to summer (2.6% and 7.7%, respectively). AAPB were on average two-fold larger than the average bacterial cells. Our results do not support the hypothesis that AAPB are advantaged in oligotrophic systems. Rather, AAPB abundance increases with DOC, which suggests that phototrophy may play a role analogous to that of cometabolism in the degradation of complex organic matter. While it is still unclear if AAPB can be considered as a coherent ecological unit, our results suggest that they follow distinct seasonal and spatial patterns, and hence could be considered as a type of microbial guild, which appears to be subject to a strong top-down regulation.

Introduction

Although discovered more than 30 years ago in Tokyo Bay (Harashima *et al.*, 1978; Shiba *et al.*, 1979), aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB) continue to be in many ways an ecological curiosity. These are osmotrophic, aerobic members of the Proteobacteria sub-division of Bacteria, and they have in common the presence of bacteriochlorophyll-*a* (BChl *a*). This pigment supports phototrophy in other organisms, such as purple photosynthetic bacteria, however, prior to the discovery of AAPB, it was exclusively linked to anaerobic processes (Shiba *et al.*, 1979; Yurkov and Beatty, 1998). The presence of BChl *a* in an aerobe is thus a defining characteristic of AAPB. BChl *a* fuels photo-induced cyclic electron transport, which results in production of energy through phosphorylation of adenosine diphosphate (ADP), but AAPB do not possess the key enzyme for CO₂ fixation in the Calvin cycle (Yurkov, 2006). The use of light thus represents a supplement to their mainly osmotrophic metabolism (Beatty, 2002), and in this sense they function as mixotrophic photoheterotrophs. It has been suggested that phototrophy could supply as much as 20% of cell ATP requirements (Kolber *et al.*, 2001; Koblizek *et al.*, 2003).

The presence of AAPB in extreme environments, such as hot springs (Hanada *et al.*, 1997) mine drainage (Hiraishi *et al.*, 2000), black smoker plumes, cyanobacterial mats, and generally very productive environments (Yurkov and Beatty, 1998) as well as in hypersaline lakes (Labrenz *et al.*, 1999) had been established. The first evidence of the widespread distribution of AAPB in aquatic systems, however, came from infrared fast-repetition-rate fluorometry measurements (IRFRR) in open waters of oligotrophic Pacific Ocean, which revealed that 2 to 5% of all photon driven electron transport could be due to these organisms (Kolber *et al.*, 2000); a follow up study later suggested that this group could comprise from 5 to 10% of total prokaryotic biomass in these oceanic areas (Kolber *et al.*, 2001). AAPB have since then been reported for a wide range of open ocean, coastal and estuarine habitats, and in very different environmental conditions (Schwalbach and Fuhrman, 2005; Eiler, 2006; Rathgeber *et al.*, 2004), using a variety of approaches; including in situ or analytical pigment quantification (Kolber *et al.*, 2000; Goericke, 2002), quantitative PCR and other DNA-based

approaches (Béjà *et al.*, 2002; Schwalbach and Fuhrman 2005, Waidner and Kirchman, 2007) and cell counts using infrared epifluorescence microscopy (Cottrell *et al.*, 2006; Sieracki *et al.* 2006). The latter approach has revealed that abundance of AAPB varies greatly both across systems and also seasonally (Masin *et al.*, 2006; Sieracki *et al.*, 2006; Zhang and Jiao 2007). AAPB have been found to comprise from less than 1% to over 40 % of the total abundance (Eiler, 2006), although most reports are between 1 and 15 % of total bacteria, with a global ocean average around 2 to 4 % (Jiao *et al.*, 2007). A few studies have additionally determined AAPB cell size, and have reported that AAPB tend to be considerably larger than the average bacterial cell size (Sieracki *et al.*, 2006; Lami *et al.*, 2007), and thus their contribution to total bacterial biomass is likely to be higher than to abundance (Koblizek *et al.*, 2005).

The initial observations of a relatively larger ratio of bacteriochlorophyll to chlorophyll *a* in open oceans led to the idea that AAPB could be quantitatively more important in oligotrophic waters (Kolber *et al.*, 2000), which was consistent with the hypothesis that photoheterotrophy could represent a competitive advantage in DOM-poor environments (Kolber *et al.*, 2001). This view was challenged first by Goericke (2002), who measured consistently low amounts of BChl *a* in a wide range of systems off the coast of California, and subsequently by others who found that the contribution of AAPB not only varied, but could actually be higher in productive waters (Schwalbach and Fuhrman, 2005; Cottrell *et al.*, 2006; Zhang and Jiao, 2007), with positive correlations with Chl *a* concentrations (Sieracki *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2007). Other studies, however, report no consistent pattern in the abundance or relative contribution of AAPB (Masin *et al.*, 2006; Sieracki *et al.*, 2006).

Overall, while there is consensus that AAPB are likely to be a significant component of microbial communities in most aquatic systems (Kolber *et al.*, 2000; Moran and Miller, 2007), the factors that influence their abundance, distribution and activity are still not well understood. This is especially true for freshwaters in general, because relative to marine and estuarine systems, there have been very few studies to focus on freshwater AAPB. The presence of AAPB in lakes has been known for decades (Yurkov and Beatty, 1998), and a few recent studies have begun to assess the

physiological aspects of AAPB (Yurkova *et al.*, 2002) and the distribution and diversity of AAPB-associated genes in lakes (Karr *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2004; Eiler *et al.*, 2009). To our knowledge, the only study to have quantitatively explored AAPB in lakes is that of Masin *et al.* (2008), who assessed AAPB abundance and biomass in 12 European lakes of different trophic status. These authors confirmed that AAPB are a significant component of lake bacterioplankton, with a range in relative abundance similar to that found in marine and estuarine systems, and further showed strong seasonal variations as well as possible links to certain environmental gradients. Clearly there is much to be learnt concerning the ecology of AAPB in lakes, the environmental and ecological factors that influence their distribution, their large-scale biogeography and the role they play in freshwater microbial foodwebs.

The general aim of this study was to explore the spatial and temporal patterns in the abundance, cell size and biomass of AAPB in northern temperate and boreal lakes, and to explore the environmental factors that influence these patterns. The choice of lakes was made so as to maximize both the trophic (in terms of phosphorous and chlorophyll) and DOC gradients, to explicitly test the hypothesis put forward by Kolber *et al.*, (2001) that photoheterotrophy is advantageous in oligotrophic, low DOC environments. The study lakes are located in three major regions of Québec (two temperate areas and one boreal), which differ in climate, underlying geology as well as plant cover making it possible to explore regional differences in the patterns of AAPB distribution.

Results

Out of a total of 158 samples that were collected between July 2007 and October 2008, 139 yielded AAPB counts, of which only 113 yielded cell size estimates due to technical problems. The data includes 43 lakes, a subset of which were visited several times to assess seasonal variation. These lakes covered a broad range of environmental gradients (Table 1); TP varied greatly from 0.8 to 177 ($\mu\text{g L}^{-1}$) and so did Chl *a* values, from 0.8 to 55.4 ($\mu\text{g L}^{-1}$) while DOC values range from 2.3 to 12.8 (mg L^{-1}) finally the maximum lake depth varied from 0.9 to 45 m.

Magnitude of AAPB abundance, size and biovolume

AAPB bacteria were detected in all the samples and their abundance spanned two orders of magnitude, from 1.51×10^3 to 5.49×10^5 cells mL^{-1} (mean $1.21 \times 10^5 \pm 9.1 \times 10^3$). The proportion of AAPB cells (%AAPB) varied from 0.07 to 37.3 % (mean 5.40 ± 0.4). Mean total bacterial cell size varied fourfold, from 0.0101 to $0.0412 \mu\text{m}^3$ (mean 0.0198 ± 0.0005) and mean AAPB cell size varied from 0.0102 to $0.206 \mu\text{m}^3$ (mean 0.0444 ± 0.004), was on average significantly larger (*t Test*, $n = 226$, $P < 0.0001$). The ratio of AAPB to total bacterial cell size was on average of 2.1 ± 0.1 . The total bacterial biovolume (total BV), calculated as the product of cell size and abundance, ranged from 5,203 to $177,961 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$ (mean $45,818 \pm 2,885$), whereas the total biovolume of AAPB cells varied from 166 to $22,306 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$ (mean $4,341 \pm 941$). The contribution of AAPB cells to total bacterial biovolume (% BV) ranged from 0.4 to 39 %, with a mean of 9.5 ± 0.8), which was significantly higher than %AAPB (*t Test*, $n = 226$, $F = 20.3$ $P < 0.0001$).

We considered the whole database and found that there was a general positive correlation between AAPB and total bacteria abundance, size and biovolume (Fig 2). The log slope of the relationship between AAPB abundance total bacterial abundance (Fig. 2a, Eq 1) is not significantly different from 1, suggesting that AAPB abundance tends to be proportional to total abundance. However there is a large degree of scatter in this relationship and relative abundance of AAPB was not correlated to total abundance (data not shown). AAPB bacterial average cell size were on average not only larger (Fig. 2b, Eq. 2), but log-slope of 1.64 suggests that AAPB average cell size are more variable than the total bacterial average size. However, the log-slope of the relationship of total AAPB biovolume to total bacterial biovolume (Fig. 2c, Eq. 3), was not significantly different from 1, although again with a large degree of scatter. Lastly abundance and size both were significantly related to the contribution of AAPB to total biovolume (%BV) (respectively, $r^2 = 0.21$, $n = 113$, $P < 0.0001$ and $r^2 = 0.13$, $n = 113$, $P < 0.0001$) yet explained very little of the variation (data not shown). In order to investigate if any patterns emerged from these overall relationships we considered both spatial and temporal structures at different levels.

Temporal variability: Daily patterns

The detailed daily time course did not reveal a consistent day/night pattern in AAPB abundance or cell size (Fig 3). Over this small time scale, AAPB abundance was strongly positively related to total bacterial abundance (Fig. 3a, Eq. 4) for both variables however, the variation was mostly within the range of method error. The relative abundance of AAPB, however, did show a clear increasing trend ($r^2 = 0.33$, $n = 23$, $P = 0.005$; Fig 4a) over the 62 hours of the experiment. At this scale, cell size of AAPB varied considerably more than total bacterial cell size (CV of 31% and 13%, respectively, Fig. 3b), and there was no relationship between the two. The same, albeit weaker, increasing trend was found with contribution of AAPB to total biovolume ($r^2 = 0.25$, $n = 23$, $P = 0.02$; Fig. 4b).

Temporal variability: Seasonal patterns

We used the data from lakes that were sampled at different times to identify seasonal patterns in the abundance, and cell size of AAPB (Fig. 4). We grouped the data into three broad seasonal categories based on time of sampling: Winter (ice cover period), Summer (stratification period) and Mixed, which included samples from spring and autumn when the water column was not stratified. This seasonal data set had a total of 99 observations of abundance, 82 of which also had average cell size. The seasonal patterns in absolute abundance of AAPB and total bacteria were different: Total bacterial abundance varied very little across seasons, whereas AAPB abundance clearly peaked in summer and fall. As a consequence there were significant seasonal differences in %AAPB (ANOVA, $n = 99$, $P < 0.0001$; Fig. 4a), which were lowest in winter (mean 2.6 ± 0.3 %), highest in the summer (mean 7.7 ± 0.8 %), and intermediate during spring and autumn mixing (mean 5.2 ± 0.9 %). The average cell size of total bacteria remained relatively constant and not significantly different across seasons (Fig. 4b, means $0.0194 \pm 0.0007 \mu\text{m}^3$ (summer), $0.0215 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$ (winter) and $0.0201 \pm 0.002 \mu\text{m}^3$ (mixed), whereas the average cell size of AAPB varied greatly across seasons (ANOVA,

$n=82$, $P=0.005$): it was on average lowest in summer (mean $0.0346 \pm 0.003 \mu\text{m}^3$), highest in winter (mean $0.0670 \pm 0.009 \mu\text{m}^3$) and intermediate during mixing (mean $0.0543 \pm 0.01 \mu\text{m}^3$) (Fig. 4b). AAPB were significantly larger than total bacteria in all seasons (*t Test*: Summer $n = 76$, $P = 0.004$; Winter $n = 63$, $F \text{ ratio} = 21$, $P < 0.0001$; Mix $n = 26$, $P = 0.03$; Fig. 4b). Temporal patterns were assessed at a finer scale using the monthly data collected on an annual cycle for the 4 temperate reference lakes (data not shown). Although the 4 lakes followed the general seasonal trends described in Figure 4, the monthly variation in AAPB abundance, %AAPB or cell size was not synchronous between lakes.

Over the seasonal cycle water temperature varied from -0.2 to 25°C , and there was a strong positive correlation between the mean monthly %AAPB and mean temperature (Fig 5a, and Eq. 5) for all the lakes for which we had seasonal data. We removed from this analysis the sample for Lake Croche corresponding to October 2008, which had an exceptionally high peak in %AAPB (37.3%). Mean AAPB cell size and mean total cell size tended to decline with mean water temperature (Fig. 5b, Eqs. 6 and 7).

Spatial variability: Vertical water column variation

Vertical profiles were carried out in the four temperate reference lakes in July 2008, during summer stratification; these included 3 depths which corresponded to the epi-, meta- and hypolimnion, as determined by water temperature and dissolved oxygen. The average values from these profiles for the 4 lakes are presented in Fig. 6. AAPB were present in all the strata and increased towards the metalimnion, whereas total abundance remained on average relatively constant with depth. As a consequence, % AAPB was on average higher in the metalimnion (mean $6.7 \pm 1.8 \%$) than in either the epilimnion (mean $4.5 \pm 1.8 \%$) or hypolimnion (mean $3.9 \pm 1.3 \%$), although differences were not statistically significant (ANOVA, $n = 12$, $P = 0.48$). Chl *a* also had metalimnetic peak (Fig. 6), although again the differences were not statistically significant (ANOVA, $n = 12$, $P = 0.55$). Cells size of AAPB and total bacteria both have lower averages in the hypolimnion but there were no statistical

differences, which contrasts from seasonal trend shown in Fig 5b where AAPB cell size reached higher values at lower water temperatures.

Spatial variability: Patterns along lake gradients

We used only the mid-summer, epilimnetic data to explore inter-regional and cross-lake patterns, so as to minimize potential effects of season and water temperature, which nonetheless varied between 18 to 25°C. The resulting data set includes individual points for 38 lakes (Table 1). The best predictor of summer AAPB abundance remained total bacterial abundance ($r^2=0.42$ $p<0.0001$), as presented for the entire data set (Eq. 1). Both were only weakly ($r^2<0.3$) correlated to environmental variables. Total bacterial abundance had a positive correlation to Chl *a* (Fig. 7a, Eq. 1., Table 3), and a negative correlation to both secchi and lake depth (Eq. 2 and 3, Table 3); AAPB abundance also had a positive trend with Chl *a*, albeit not statistically significant (Fig. 7a), and a negative correlation with secchi (Eq. 4, Table 3). AAPB abundance increased with DOC (Fig. 7b, Eq. 5, Table 3), and although this relationship is weak ($r^2=0.2$ $p=0.005$), the fact total BA was completely unrelated to DOC (Fig. 7b) meant that in terms of relative abundance of AAPB, DOC significantly explained a certain portion of the variation ($r^2=0.28$, $p<0.0001$). The %AAPB, however, was most strongly correlated to the ratio between DOC and Chl *a* (Fig. 7c, Eq. 8 Table 3); the sites with the higher ratios being the ones where the higher relative abundances were found.

The model that best explains the cross-lake variation in %AAPB ($r^2=0.54$ $p<0.0001$), contains both the ratio of DOC to Chl *a*, and temperature (Eq 14, Table 3). Temperature has a negative coefficient in this model, opposite to that of the seasonal temperature model presented in Eq. 5. (Table 2). %AAPB was significantly lower in the Laurentians (mean $4.09 \pm 0.48\%$) compared to Eastern-Townships (mean $6.96 \pm 1.09\%$) and the boreal region (mean $8.14 \pm 0.67\%$) (ANOVA, $n=38$ $P=0.002$), but there were also significant differences in temperature between all three regions during the summer (ANOVA, $n=38$ $P<0.0001$), and thus temperature may be acting as a surrogate for a regional difference. We further explored if there was a regional component in the cross-lake patterns of

AAPB, by incorporating to the analysis a categorical regional variable. Region was highly significant in a multiple regression model of %AAPB, and together with the ratio of DOC to Chl *a* explained 49% of the variability in %AAPB. Likewise, region was highly significant in a multiple regression model of summer AAPB abundance, and together with total bacterial abundance, accounted for 59% of the variability in AAPB.

Average bacterial cell size tended to increase with DOC concentration (Eq. 9, Table 3), whereas mean AAPB cell size was not significantly related to any environmental variable, and total biovolume seemed to increase with productivity; it was positively correlated to phosphorus and inversely correlated to water transparency both explaining significant portions of variation (Eq. 9 and 10, Table 3). The variation in average AAPB cell size averages were not linked to any of the variables measured, hence no strong trends were found either with biovolume of AAPB portion of these communities.

Discussion

In this study we have used infrared-epifluorescence microscopy to enumerate and size bacteriochlorophyll-*a* containing cells, and this approach has some limitations (Cottrell *et al.*, 2006). Counts were corrected for cells that contain Chl *a*, but there is the possibility that some non-AAPB were included, for example, other groups of bacteriochlorophyll-containing bacteria such as purple bacteria, but these are not expected to be abundant in any of our samples. Our counts of replicate samples had a similar level of variability as replicate counts within a sample (<20%), and both were well below the natural variability in both the abundance and the proportion of AAPB, such that it was possible to identify emerging patterns. Cell size, on the other hand, did show a much wider variation both within and across samples compared to abundance, and some samples had events with extreme values, which may have been either filamentous or aggregated cells, or perhaps not even cells at all, and this has been noted before (Sieracki *et al.*, 2006; Lami *et al.*, 2007; Masin *et al.*, 2008). Close

inspection of the images used to determine cell size confirmed that most of the objects selected by the automatic procedure were in fact cells and not debris or other types of particles. The samples with the most extreme events were removed from subsequent analyses to avoid potential biases.

We detected AAPB in all lakes studied, thus confirming the widespread and persistent presence of this group in northern lakes of different types and regions. In this regard, our study greatly extends the initial findings of Masin *et al.* (2008), which explored the distribution of AAPB in 12 northern European lakes. We found that the relative abundance of AAPB ranged from less than 1% to over 17% (with one exceptionally higher value of 37%), and was well within the range previously reported for open oceans (Cottrell *et al.*, 2006; Masin *et al.*, 2006; Sieracki *et al.*, Lami *et al.*, 2007;), coastal areas (Schwalbach and Fuhrman, 2005; Zhang and Jiao, 2006), estuaries (Waidner and Kirchman, 2007), and lakes (Masin *et al.*, 2008). We have also shown that lake AAPB are significantly larger than the average bacterial cells in these communities, as was noted before for marine systems (Sieracki *et al.*, 2006; Lami *et al.*, 2007). One of the main observations in our study is that AAPB cell size is extremely variable, both across lakes and within a lake in time, as has been noted before (Yurkova *et al.*, 2002). The variability in AAPB cell size over the course of a three-day diurnal study (0.0164 to $0.0555 \mu\text{m}^3$; 0.0109 , SD) was in the order of 25% of that observed over the course of the entire year in the same lake (0.0235 to $0.158 \mu\text{m}^3$; 0.0484 , SD). This in turn would suggest that whereas abundance seems to be quite tightly regulated, AAPB cell size is very dynamic and probably responding to environmental and biological forcing. One of the consequences of the larger average size of AAPB is that their contribution to total bacterial biomass was considerably higher than to abundance (overall average of 10% and 6%, respectively).

AAPB clearly tracked total cell abundance, both across systems, and within systems in time, and we found that of all the variables considered, the best predictor of AAPB abundance was total bacterial abundance. The covariation of AAPB and total bacterial abundance is implicit in several previous studies (Jiao *et al.* 2007, Salka *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) but has seldom been actually quantified. This pattern of covariation would suggest that AAPB respond to the same basic

environmental drivers and are subject to a similar overall regulation as the bulk of the bacteria community. However, as a group they appear to be more dynamic than the whole community, and there was a large degree of scatter in this relationship, some of this scatter was seasonal and also regional, as we discuss below.

Temporal dynamics

There was large seasonal variability in the absolute and relative abundance of AAPB; the seasonal pattern was somewhat erratic and different among lakes, and we did not observe the rather smooth seasonal succession hypothesized by Masin *et al.* (2006). The only common feature between lakes was a steep decline in both AAPB abundance and %AAPB in winter during ice cover. The relative abundance declined on average by more than two-fold in winter relative to summer. It would thus appear that either winter conditions are detrimental to AAPB relative to strict heterotrophs, or that AAPB persist in the system but some lose their pigment and are therefore not detected. There are relatively few studies that have explored the seasonal dynamics of AAPB, especially under the ice, and the results are conflicting. For example, like us, Masin *et al.*, (2008) found a winter minimum of %AAPB in European lakes, Cottrell and Kirchman, (2009) found no difference in %AAPB seasonally in the Arctic, whereas Zhang and Jiao, (2007) found that %AAPB actually increased during the winter in Eastern China Sea. No experimental studies, however, have determined experimentally whether or not water temperature has a clear impact on AAPB physiology. Lastly, the magnitude of annual variability in %AAPB was similar to that observed during the detailed three-day diurnal cycle in Lake Croche (%AAPB range from 0.5 to 10.6 % plus one at 37%, and from 2.5 to 7.0%, respectively). This would suggest that superimposed to the seasonal trends in AAPB abundance, there are short-term dynamics that are equally important in magnitude, but probably driven by very different factors.

Relationship with temperature and light

Among the factors that may drive the large-scale seasonal variability in AAPB are temperature and light. The synthesis of Bchl *a* is thought to only occur under aerobic conditions in

addition to being inhibited by light (Shiba *et al.*, 1979; Yurkov and Beatty, 1998), and is only detected experimentally after several hours of darkness (Koblizek *et al.*, 2005). It is clear that over short temporal scales (day/night) light does play a major role in regulating BChl *a* synthesis, and probably AAPB metabolism (Hiraishi *et al.*, 2000; Kolber *et al.*, 2001; Suyama *et al.*, 2002; Koblizek *et al.*, 2003). The role of light over longer scales, however, is still unclear and might be different than its role in the diurnal regulation of the metabolism. In this regard, some *in situ* examples challenge the notions brought forth by small time scale light regulation. For example, AAPB synthesizing BChl *a* have been detected in surface layers during the Arctic summer under continuous illumination and under winter ice (Cottrell and Kirchman, 2009), opposing the notion that BChl *a* is synthesized only in the dark. Our own results show that cells containing BChl *a* are still detectable in winter and in the hypolimnion despite prolonged periods of complete darkness or extremely low light intensities. This suggests that light is not essential for the survival of these cells, or for the expression of the pigment.

Since it is clear that AAPB can survive over long periods on osmotrophy alone, the question is then, why are there pigmented cells under the ice, or in the hypolimnia of lakes. The latter is interesting from a bioenergetic viewpoint, because the synthesis and turnover of pigment is considered energetically costly (Eiler 2006). AAPB cells are known to lose all Bchl *a* during long *in vitro* incubations in the dark (Biebl and Döbler 2006; M. Koblizek, per. com.), so their presence under the ice or in deep layers might be indication of some level of light availability. Light can penetrate ice, especially at the beginning and end of winter when the ice is thinner and the snow cover thin or absent. We did not measure under-ice light intensity but the environmental conditions prevailing during winter would suggest very little light penetration: in 2008, the average ice thickness of our study lakes was 80 cm over the winter, and the average snow cover over the ice was 20 cm, so that light penetration during much of the winter was necessarily extremely low, albeit perhaps not zero. Likewise, the light profiles carried out during the summer stratification show that most of the upper layers of the hypolimnia of the sampled lakes were exposed to small yet measurable light levels, usually below 1-2% incident light intensity. The presence of AAPB cells with Bchl *a* suggests the possibility that

AAPB may utilize extremely low intensities of light that might still be present during winter under the ice and in the hypolimnia, and may explain why we found the highest relative densities in the metalimnion of lakes.

We found a strong positive correlation between temperature and %AAPB using all the seasonal data. Previous studies have reported contrasting results concerning the relationship between AAPB and temperature in marine systems: Schwalbach and Fuhrman, (2005) and Zhang and Jiao, (2007) found no relationship with temperature in marine sites, whereas Sieracki *et al.*, (2006) and Masin *et al.*, (2006) postulated that AAPB could be mainly regulated by temperature. The sparse data on cultured AAPB show growth temperature optima that are generally in the range of 30 to 35 °C (Hiraishi *et al.* 2000; Koblizek *et al.*, 2003), while maximum BChl *a* content was found between 20 and 25 °C (Koblizek *et al.*, 2003), hence this could also explain the decline in AAPB in winter in addition to the general lack of light. It is interesting to note that the overall positive relationship between %AAPB and temperature does not hold for the vertical distribution of AAPB within lakes, because we found on average the highest contributions of AAPB in the metalimnion, at intermediate temperatures. This in turn suggests that there may be interactions between temperature and light availability that determine the relative importance of AAPB within the bacterioplankton community. If we only focus on the mid-summer period (in the 18 to 25°C range), %AAPB was negatively correlated to temperature. The fact that %AAPB is positively correlated to temperature over the entire seasonal cycle, but negatively correlated at high temperatures could suggest physiological thresholds that affect AAPB differentially relative to the bacterial community, which tend to decouple the abundance patterns of both.

Patterns in abundance and cell size along environmental gradients

Most studies to date agree that the major benefit of phototrophy to AAPB could be the reduction of their carbon demand through the generation of ATP, which would increase the organic carbon substrates assimilated into cell material, and thus the overall growth efficiency (Kolber *et al.*, 2001; Koblizek *et al.*, 2005; Eiler, 2006). It has been further suggested that phototrophy might

facilitate substrate and nutrient uptake, especially under very dilute conditions, by directly powering capture and membrane transport (Yurkov and Beatty, 1998; Yurkova, 2006, Masin *et al.*, 2006). In either scenario, phototrophy should be favored in oligotrophic conditions of C starvation and extreme nutrient limitation, where there is light available, such as oligotrophic ocean surface waters (Kolber *et al.*, 2001; Beatty, 2002). In support to this hypothesis, culture studies with strains of AAPB have shown that C availability influences pigment synthesis and phototrophy, with cells switching to a completely heterotrophic metabolism when placed in organic-rich medium, and resuming synthesis of BChl *a* upon substrate depletion (Suyama *et al.*, 2002).

Our results do not support the hypothesis that photoheterotrophy is advantageous in oligotrophic environments, and we found no relationship between the proportion of AAPB cells and Chl *a* or TP. Others have previously reported either no apparent link to system trophic status (Goericke, 2002; Lami *et al.*, 2007), or a positive relationship (Zhang and Jiao, 2007) in marine and estuarine systems. The lack of relationship with chlorophyll would further suggest that AAPB do not covary with planktonic autotrophs and thus are probably subject to a different regulation.

Interestingly, and counter to what was expected, both AAPB abundance and %AAPB tended to increase with DOC concentration, whereas total bacterial abundance was not related to DOC. In fact, the best predictor of the %AAPB was the ratio of DOC to chlorophyll, and the %AAPB tended to be higher in lakes with both high DOC and low chlorophyll. This pattern, which has not been described before, suggests that AAPB do not necessarily have an advantage in environments with low C concentration, and in agreement with these results, Eiler *et al.* (2009) reported that the prevalence of Bchl *a* synthesis genes was higher in humic relative to clear-water lakes. The proportion of AAPB in European temperate lakes, however, was found to be highest where DOC levels were low (Masin *et al.*, 2008). It may not be the total amount of organic C that is relevant to the development of AAPB, but rather its nature. For example, Yurkov and Beatty suggested in their review (1998) that cultured AAPB are characterized by the capacity of utilizing a large variety of organic carbon sources, and that complex culture media resulted in enhanced growth. It is possible that as the DOC pool increases and

lakes become more dystrophic, the C pool becomes chemically and structurally more complex, and that AAPB may have an advantage under these circumstances. The presence of a phototrophic pathway may provide a kind of energetic primer that allows AAPB bacteria to utilize complex and recalcitrant substrates, for example, humic compounds, that would otherwise be energetically inefficient to access, in a process analogous to cometabolism (Farjalla *et al.*, 2009).

We further found significant differences in the average summer proportion of AAPB across the three study regions, and as we discuss below, these differences could not be explained solely on the basis of systematic differences in temperature between regions. The lowest %AAPB occurred in the Laurentian lakes, which not only had the lowest DOC concentrations, but also have a DOC that is characterized by a lower specific absorption relative to that in the other two regions (J. F. Lapierre, per. com.), again suggesting a potential link between the quality of the DOC pool and the distribution of lake AAPB.

Ecological significance of AAPB

A key unresolved issue concerning AAPB ecology in general is whether cells that contain BChl *a* and express the associated metabolic function can be considered a true functional group that shares common regulation and environmental requirements, and which occupies a similar niche. As opposed to the initial notion of AAPB as a “relatively uniform, widespread class” (Kolber *et al.*, 2001), we now know that photoheterotrophy based on Bchl *a* is widely distributed within the Proteobacteria (Béjà *et al.*, 2002), and that there may be many coexisting phylotypes that can express this function within a given environment (Karr *et al.*, 2003; Waidner and Kirchman, 2008). There is also increasing evidence for biogeographical patterns at different scales, in the distribution of organisms containing this function, such that the AAPB are not always composed by the same players (Béjà *et al.*, 2002; Jiao *et al.*, 2007; Yutin *et al.* 2007). Do the metabolic capabilities associated to the trait lead to ecological and functional convergence that justify grouping these organisms together? There are two scenarios under which AAPB could conceivably become an ecologically coherent grouping: 1) that the metabolic functionality conferred by this trait be of such relevance that it overrides differences in other

traits such that groups that are phylogenetically distant, and different in many of their intrinsic properties may converge ecologically on the basis of this trait; 2) that the functionality conferred by BChl is not in itself determinant, but that its presence is linked to other key functional traits, such that phylotypes that contain Bchl and can express photoheterotrophy, also have other commonalities perhaps in terms of tolerance to conditions, metabolic plasticity, and functional capacities.

The emerging spatial and temporal patterns of distribution of AAPB that we found in lakes provide indirect evidence for the above scenarios. On the one hand, our results show that AAPB are far from being a homogeneous group in terms of cell size and morphology, and the wide range of size may be a reflection of the potentially high level of diversity within this functional group. Moreover, AAPB clearly covaried with total cell abundance over different spatial and temporal scales, suggesting that the abundance of this group follows the same broad patterns as the community. On the other hand, AAPB were consistently larger than the average bacterial cell in all lakes studied, and were positively related to DOC, whereas total bacteria were not. Likewise, the temperature-dependence of AAPB was clearly different from that of the ensemble of bacteria, which would suggest a distinct range of temperature preference and a collective physiological response of AAPB. It would thus seem that the AAPB form a group that may be acting as a “guild”, sharing some basic functional traits, but that the relatively weak and often contrasting patterns that are found could be linked to the heterogeneity within this AAPB guild in terms of phylogenetic structure.

Top down regulation and ecological implications

In this paper we have focused on the patterns of abundance, cell size and biomass along environmental gradients, but it is likely that biological interactions play a major role in the regulation of AAPB. There are several lines of evidence that suggest strong top-down control of the AAPB component in lakes. Grazing on bacteria by protists and microzooplankton is strongly size-dependent (Gonzalez *et al.*, 1990), such that very small or very large cells may escape predation. Whereas we observed in all samples both extremely large (often filamentous) and small cells, most AAPB cells are within a size range that renders them very vulnerable to grazing (del Giorgio *et al.*, 1996), and it is

very likely that AAPB are preferentially removed and thus subject to strong predation control, as was proposed by Sieracki *et al.*, (2006). In addition, there is evidence that AAPB are not only on average larger, but also consistently more active than the bulk of bacterioplankton (Koblizek *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010), which further increases the vulnerability of AAPB to both grazing (del Giorgio *et al.*, 1996) and viral infection (Bouvier and del Giorgio, 2007). The fact that AAPB abundance and size vary widely over very short time scales (i.e. during the daily cycle) would necessarily indicate high losses as well as rapid turnover, and thus our results tend to support the hypothesis that AAPB tend to be highly active. High potential growth, combined with a consistently low relative abundance observed in most samples would indeed suggest a strong top-down control of this guild as a whole. Nevertheless, we have also found instances of clear uncoupling between AAPB and BA both at the surface and in deeper layers, with a peak reaching 37%, suggesting the possibility that under certain circumstances AAPB may escape top-down regulation and even form “blooms”.

We conclude that AAPB are a ubiquitous component of bacterioplankton in northern temperate and boreal lakes, their relative contribution being remarkably similar to that reported for lakes elsewhere and for marine systems, and somewhat lower to that reported for estuaries. The AAPB component appears to have a different temperature-dependency from that of the rest of the community, which determines in part the observed annual cycle in both absolute and relative abundance, characterized by a steep winter decline. Although it is still unclear if AAPB can be considered as a coherent ecological unit, the evidence would suggest that they follow seasonal and spatial patterns that are distinct from those of the bulk community, and could thus be considered as a type of “guild”, which seems to be subject to a strong top-down regulation. Their contribution to total bacterial abundance, and particularly biomass, is not negligible, and as has been hypothesized for marine systems (Koblizek *et al.*, 2005; Sieracki *et al.*, 2006; Lami *et al.*, 2007), their potential contribution to community metabolism and C flow in lakes is probably even more significant, but remains to be assessed.

Experimental procedures

Sites and sampling

We sampled lakes in three different regions (Fig. 1) to investigate any large-scale biogeography in distribution patterns. In northern Québec, we sampled the Boreal region near Eastmain (52°14'N, 75°W), which contains an extensive freshwater network covering over 20% of surface in a landscape of mature evergreen forest dominated by black spruce (*Picea mariana*). In temperate southern Québec, we sampled two distinct regions: The Laurentian region located in the Canadian Shield, North of Montréal (45°59'N, 74°01'W), dominated by granitic bedrock and mostly covered by mixed forest (>95%), and the Eastern-Townships regions, located south of Montréal (45°24'N, 72°12'W) in the St-Lawrence Lowlands, dominated by sedimentary geology that results in a higher average pH and alkalinity in these lakes (Carignan *et al.*, 2000) and with watersheds that are characterized by different land uses related to human activities.

In all, 43 lakes were sampled, 17 in the boreal region, 13 in the Laurentians, and 13 in the Eastern Townships. Out of this total, 26 were sampled only once, whereas 17 were visited on more than one occasion: We carried out a complete annual cycle in 4 lakes, two in the Laurentians (Connelly and Croche), and 2 in the Eastern Townships (Bowker and Bran-de-Scie); these lakes were sampled monthly, including 3 under-ice winter samples. Thirteen out of the 17 boreal lakes were sampled 3 to 6 times, including at least one sample under the ice. In addition, we carried out a detailed diurnal cycle in Lake Croche (Laurentians) covering 62 hours with samples taken every 3 to 4 hours, for a total of 23 sampling times.

Sampling was always conducted over the deepest central part of the lakes, and at each sampling location, we carried out a complete vertical profile of temperature, O₂, and conductivity, using an YSI (600 XLM-M probe) and measured secchi depth. Water samples were collected at one meter from the surface, and exceptionally within the metalimnion and hypolimnion when vertical

profiles were conducted. Water was collected with a peristaltic pump into 18L carboys and processed within less than 8 hours in the lab.

Chemical analysis

Total phosphorus (TP) was measured using the molybdenum-blue method, after potassium persulfate digestion. Dissolved organic carbon (DOC) as well as dissolved inorganic carbon (DIC) were measured on a TIC TOC Analyser (O.I. Analytical) using a high-temperature persulfate oxidation method. For Chlorophyll *a* (Chl *a*) we filtered one liter of water on GF-F 47 mm diameter glass microfiber filters (Whatman), and we used a 10 minute hot 90% ethanol (78°C) followed by overnight cold (4°C) extraction after which we determined the Chl *a* concentration using the absorbance at 665 nm using a UV/Vis Ultrospec 2100 spectrophotometer (Biochrom Ltd.) (Wetzel and Likens, 1991).

Abundance and size of AAPB

Samples for the microscopic enumeration of total and AAP bacterial abundance were fixed immediately after collection with 1% glutaraldehyde final concentration and kept refrigerated in the dark. Back in the lab, samples were filtered onto 0.2- μ m pore-size black polycarbonate filters (Whatman no. 110656) and immediately stored at -80°C. We had initially (October-November 2007) filtered 3 ml, but later increased this volume to 6 ml because the former resulted insufficient AAPB cell numbers for accurate counts. Total and AAPB abundance and average cell size were determined by infrared epifluorescence microscopy, as described by Cottrell et al., (2006). In brief, filters were stained for five minutes with 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 2X phosphate-buffered saline solution. The microscope (Olympus Provis AX70) was coupled to a charge-coupled-device camera capable of IR detection (Intensified Retiga Extended Bleu; Q imaging), and for each sample 20 fields were captured and analyzed using image analysis software (ImagePro Plus, Media Cybernetics). For each field 4 different images were recorded, each at a different excitation wavelength to enumerate total bacteria (DAPI-stained), and to discriminate AAPB cells, which fluoresce in the IF, from cells

containing chlorophyll *a* (Chl *a*) and phycoerythrin-containing cells (PE), which emit light in the orange and red. The excitation / emission combinations were as follows: 360 nm and 460 nm for DAPI; 390 and 750 nm for AAPB cells; 480 and 660 nm for Chl *a* containing cells, and 545 and 610 nm for PE containing cells. Detecting the edges with Laplacian and Gaussian filters applied in series identified cells. The filtered images were segmented into binary format and then overlaid to identify cells with DAPI and IR fluorescence but not with Chl *a* and PE fluorescence. In addition to abundance, cell size was also determined by image analysis using the integration method proposed by Sieracki (2006). The average cell volume determined for AAPB cells, based on cell autofluorescence, was standardized to DAPI-based cell volume using a conversion factor of 0.218, which was empirically obtained from ten representative samples.

For a subset of 13 samples we prepared replicate filters, and compared the intra-sample variation in counts (i.e. variation between fields within the same filter) with the inter-replicate variation (i.e. variation in the average counts of two replicate filters). The average coefficient of variation for the proportion AAPB cells was similar between fields within a sample compared to the average for replicate filters ($33.3 \pm 8.4\%$ and $28.9 \pm 3.6\%$, respectively).

Statistical Analysis

For all the statistical analysis we used the software JUMP 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Least squares linear regressions were used to assess links between response and explanatory variables while multiple stepwise regression was used to identify any combined effects. The data was log transformed to assure normality and homoscedasticity in the data, which was confirmed using a Shapiro-Wilk test. ANOVA was used to test seasonal or regional differences in the key variables. ANCOVA was used to assess there were potential differences in the patterns of total bacteria and AAPB along environmental gradients.

Acknowledgements

We thank Marilou Bergevin, Catherine Beauchemin, Alice Parkes, Delphine Marchand, Simon Barrette, Annick St-Pierre, Pierre Marcoux, François Guillemette and Véronique Ducharme-Riel for their help with collection and analysis of samples. Thank you H.S.C for inspiration. The work was supported by grants from the National Science and Engineering Research Council of Canada as well as the National Science Fund (U.S).

Table 1. Summary of environmental conditions in the lakes for the three different sampling regions (BOR-*Boreal*, LAU-*Laurentian* and EST-*Eastern Townships*). The average and range (\pm standard error) for dissolved organic C (DOC), total phosphorous (TP), chlorophyll a (Chl a), Secchi, maximum depth (Max depth) and water temperature (Water temp) are presented only for the for the summer period of 2008.

Summary of Environmental Conditions (Summer 2008 Data)							
Regions		DOC (mg L ⁻¹)	TP (μ g L ⁻¹)	Chl a (μ g L ⁻¹)	Secchi (m)	Max depth (m)	Water temp (°C)
BOR	Range	5.2 - 10.3	4.4 - 31.1	1.6 - 2.6	0.5 - 2.8	0.9 - 16.2	18.0 - 20.3
	Mean	8.1 \pm 0.5	12.0 \pm 1.9	2.2 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2	9.0 \pm 1.2	19.0 \pm 0.2
EST	Range	2.3-12.8	3.6 - 177	0.8 - 55.4	0.25 - 8.9	2.7 - 31.5	19.1 - 23.1
	Mean	8.1 \pm 1.0	30.5 \pm 13.8	10.5 \pm 4.4	2.6 \pm 0.6	14 \pm 3.0	20.1 \pm 0.3
LAU	Range	2.6-7.8	4.5 - 31.2	1.1 - 4.6	1.1 - 7.1	1.1 - 45.4	21.1 - 25.0
	Mean	4.9 \pm 0.4	10.7 \pm 1.9	2.7 \pm 0.3	3.5 \pm 0.4	12.2 \pm 3.1	22.9 \pm 0.3

Table 2. Regression models relating AAPB variables to total bacteria and to temperature using the complete data set, including summer and winter samples.

Single and Multiple regression models between key variables				
Model	<i>N</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	Eq
Log AAPB = -2.04+0.92 Log BA	139	0.34	<0.0001	(1)
Log AAPB SIZE = 1.3+1.64 Log total size	113	0.35	<0.0001	(2)
Log AAPB BV = -1.7+1.11 Log total BV	113	0.46	<0.0001	(3)
Log AAPB = -4.2+1.08 Log BA	23	0.81	<0.0001	(4)
%AAPB = 2.59 + 0.29 (temperature)	11	0.44	0.02	(5)
AAPB size = 0.078-0.0024 (temperature)	11	0.26	0.1	(6)
Total size = 0.025-0.00032 (temperature)	11	0.41	0.03	(7)

Table 3. Simple and multiple regression models describing the cross-lake patterns in AAPB and total bacteria as a function of environmental variables during the summer (July and August samples). The models are linear regressions based on the log-transformed data.

Model	<i>N</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	Eq
Log BA = 6.3 + 0.23 log (Chl <i>a</i>)	38	0.21	0.004	(1)
Log BA = 6.5 - 0.31 log (Secchi)	38	0.27	0.0009	(2)
Log BA = 6.2 - 0.26 log (Max depth)	38	0.27	0.001	(3)
Log AAPB = 5.2 - 0.51 (log Secchi)	38	0.26	0.001	(4)
Log AAPB = 4.6 + 0.70 log (DOC)	38	0.20	0.005	(5)
Log %AAPB = 0.23 + 0.66 log (DOC)	34	0.28	0.001	(6)
Log %AAPB = 0.47 + 0.67 log (DOC:Chl <i>a</i>)	34	0.39	<0.0001	(7)
Log total size = -1.94 + 0.24 log (DOC)	29	0.27	0.004	(8)
Log total BV = 4.82 - 0.47 log (Secchi)	29	0.48	<0.0001	(9)
Log total BV = 4.24 + 0.4 log (TP)	29	0.45	<0.0001	(10)
Log total BV = 4.13 + 0.66 log (DOC)	29	0.36	0.0006	(11)
Log AAPB BV = 3.72 - 0.59 log (Secchi)	29	0.23	0.008	(12)
Log AAPB BV = 2.74 + 1.0 log (DOC)	29	0.23	0.008	(13)
Log %AAPB = 1.72 + 0.4 log (DOC: Chl <i>a</i>) - 0.05 (temperature)	34	0.54	<0.0001	(14)

Figure Legends

Fig. 1. Map of Québec showing the sampling areas. Lakes were sampled within three regions; (A) the Laurentians (LAU; 45°59'N, 74°01'W), (B) the Eastern-Townships (EST; 45°24'N 72°12'W) and (C) Boreal (BOR 52°14'N 75°W). All samples were collected between July 2007 and October 2008.

This map was reproduced with the permission of Natural Resources Canada 2010, from The Atlas of Canada.

Fig 2. Relationship of AAPB to total community abundance (a; Eq. 1, Table 2), cell size (b; Eq. 2, Table 2) and biovolume (c; Eq 3, Table 2), comprising all data collected between July 2007 to October 2008 are shown. Data are log-transformed, and the line is the least-square regression.

Fig 3. Daily variation in abundance (a) and of cell size (b) of total bacteria (triangles), AAPB (circles), and proportion of AAPB proportion (solid circles). Error bars are only for first and last samples for visual clarity. Dark rectangles at the top of panels represent the night period. Sampling was done in lake Croche from the 22nd to the 25th of July 2008.

Fig. 4. Box-and-whisker plots showing average seasonal trends in the relative abundance of AAPB and AAPB biovolume (a), as well as in average cell size of both AAPB and total bacterial (b). Stars indicate significant differences in seasonal averages ($p < 0.05$).

Fig. 5. Relationship of temperature with %AAPB (a) and average cell size (b). Each point represents monthly averages, solid circles refer to AAPB values and triangles refer to the total bacterial community, except for the month of October where the sample from lake Croche with one exceptionally high (37%) value was excluded (see text for further details). Error bars represent the standard error on mean.

Fig. 6. Average water column distribution. The average values for the epilimnion, metalimnion and hypolimnion were obtained from samples taken in July 2008 in four lakes (Bowker, Bran-de-Scie, Connelly and Croche). The dashed lines represent the average %AAPB (pink circle) and the average Chl *a* (green diamonds) concentrations and they are projected on the bottom x axis, while solid lines represent total bacterial (triangles) and AAPB (circles) abundance and they are projected on the top x axis. Error bars represent the standard error of the mean.

Fig 7. Relationship of total bacteria abundance (triangles) and AAPB abundance (circles) with DOC (a) and Chl *a* (b), and the relationship between %AAPB and the DOC : Chl *a* ratio (c). The four most eutrophic lakes are represented with the green circles, they do not follow the general trend, and were excluded from the regression shown in c. Data is presented on log scales. All 38 lakes were sampled in mid-summer 2008.

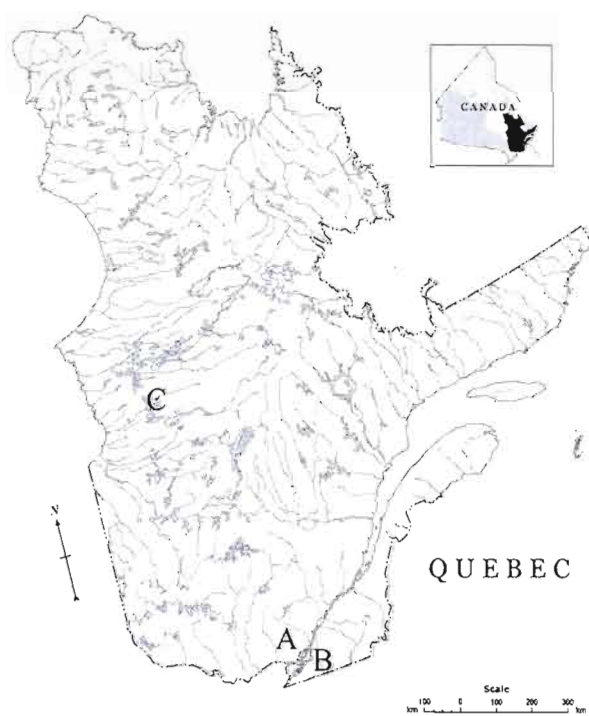


Figure 1

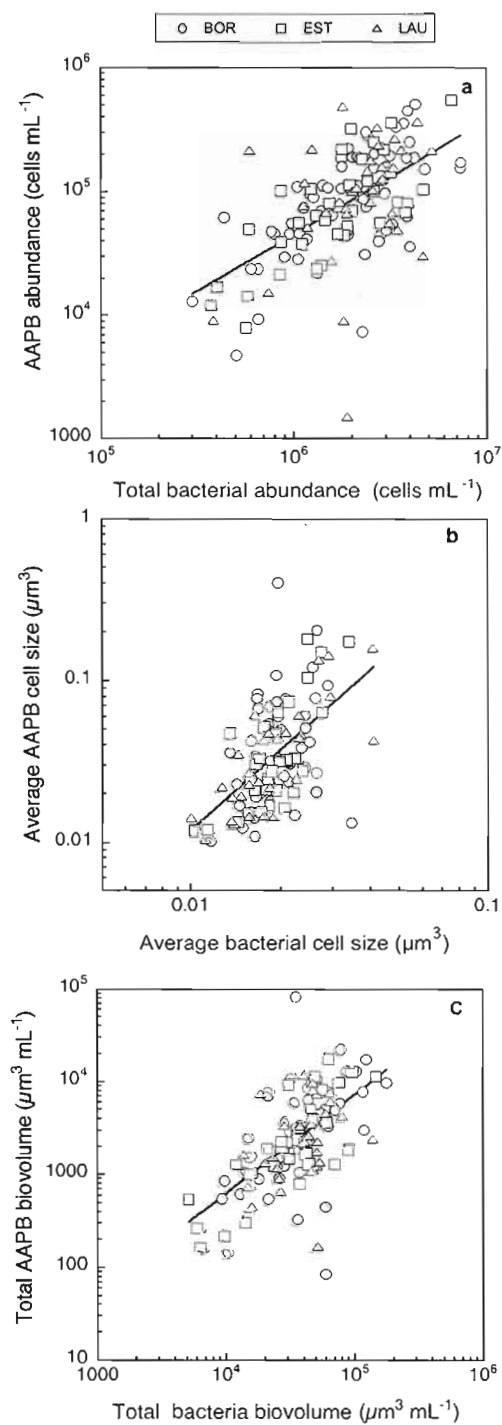


Figure 2

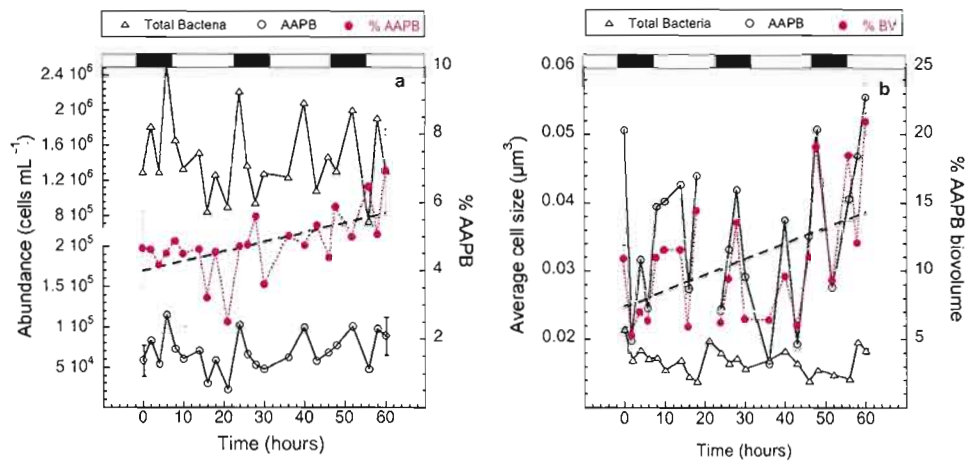


Figure 3

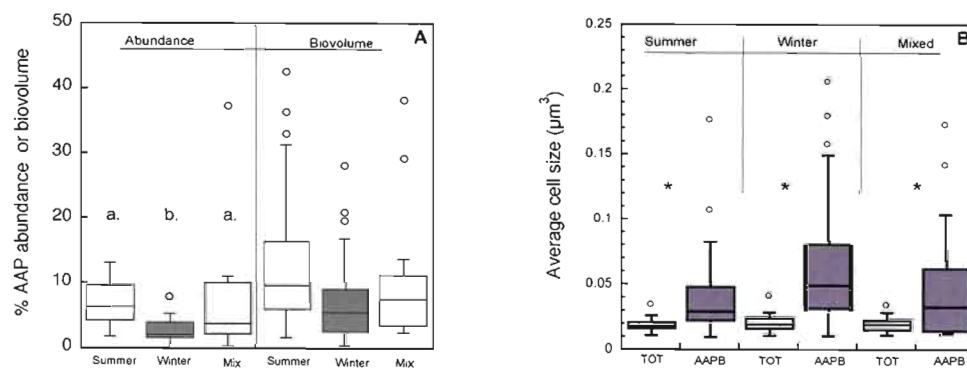


Figure 4

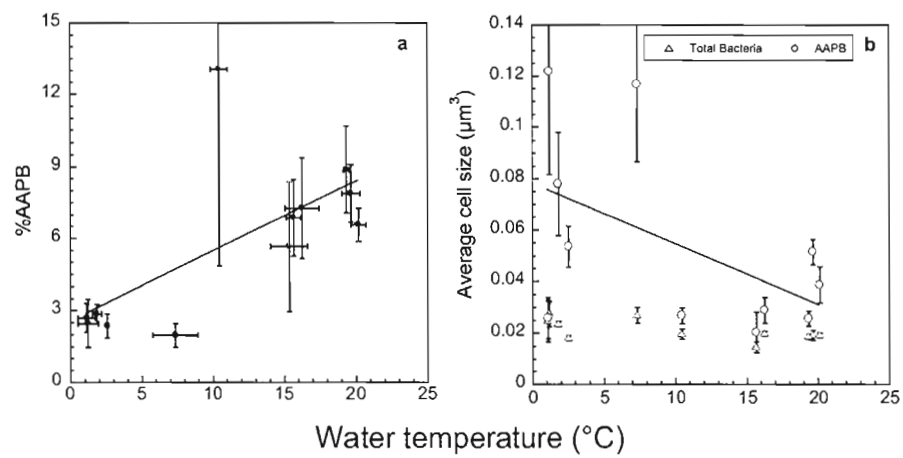


Figure 5

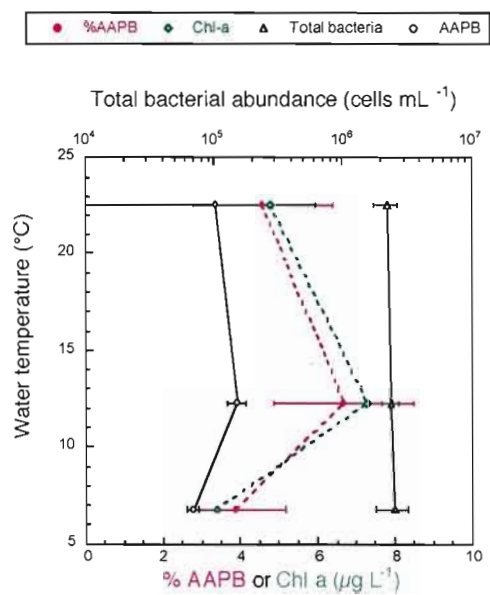


Figure 6

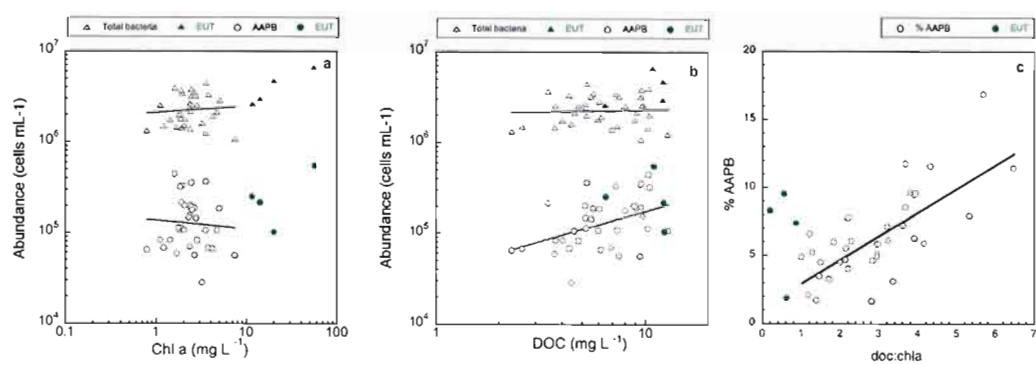


Figure 7

CONCLUSION

Depuis la découverte des bactéries aérobiques anoxygéniques phototrophiques (AAPB) il y a trente ans, il y a eu des développements méthodologiques qui ont grandement contribué à augmenter notre connaissance de ces mixotrophes. Les AAPB sont en voie de passer d'un statut de curiosité métabolique à celui de groupe écologique. Par contre il subsiste toujours d'importante lacune au niveau de la connaissance de leur écologie générale et en particulier, les milieux d'eaux douces ont grandement été oubliés. Notre étude vient pallier ce dernier manque avec une importante évaluation de la présence des AAPB dans les lacs, mais aussi des idées nouvelles concernant leur écologie.

Les AAPB étaient présentes dans tous les lacs échantillonnés, ce qui nous permet d'établir que les AAPB sont ubiquistes en eaux douces comme dans le milieu marin. Leur abondance relative présente une importante variation (>1 % à 37 %) avec une moyenne générale de 5.4%, comparable à celle des milieux marins (Jiao *et al.*, 2007). Par ailleurs, nos données confirment que leur taille est significativement plus élevée que celle de la communauté en général, or la moyenne de proportion en biomasse (10 %) est plus importante que celle l'abondance. Enfin, il semble que l'abondance et la taille des AAPB ne sont pas régulées par les mêmes facteurs, puisque la taille varie beaucoup plus que l'abondance. Nos résultats démontrent que l'abondance des AAPB suit de près celle de la communauté totale, cette relation implicite dans la littérature (Jiao *et al.*; 2007; Salka *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) n'avait jamais été quantifier avant. La variation dans celle-ci est en partie liée à des patrons temporeux et spatiaux distincts entre les AAPB et la communauté bactérienne totale.

La dynamique temporelle des AAPB observée est plutôt erratique, ce qui est contraire à l'idée de succession saisonnière observée dans la mer Baltique par Masin *et al.* (2006). Nous avons néanmoins observé une diminution importante dans l'abondance relative moyenne de l'hiver comparé à celle de l'été (2.6 % et 7.7%, respectivement). Ce qui implique que les conditions qui règnent en hiver sont soit délétères pour les AAPB, soit elles persistent, mais la plupart perdent leur pigmentation. Nous

démontrons aussi que la variation à très courte échelle est également très importante (2.5% à 7.0% à l'intérieur de 62 heures), ce qui pourrait se confondre la variation saisonnière, bien que les dynamiques à ces deux échelles de temps soient probablement reliées à différents mécanismes de contrôle. La variation annuelle pourrait être relié à la température puisque nous avons trouvé une relation positive entre cette variable et l'abondance, qui d'une part est absente dans la distribution verticale et qui change lorsque considérée par saison. Ainsi entre 18 et 25°C, cette relation devient négative, mais elle présente une forte stratification régionale, ce qui fait en sorte qu'il est difficile de discerner s'il s'agit d'un potentiel seuil physiologique distinct des AAPB ou d'un effet régional.

La portion variation spatiale et environnementale de notre étude avait aussi pour but de vérifier l'hypothèse principale qui veut que la photohétérotrophie représente un avantage dans les milieux peu productifs (Kolber *et al.*, 2001) qui est entre autre supporté par les études physiologiques qui démontrent que la disponibilité en carbone influence la régulation de l'expression de la Bchl *a* (Suyama *et al.*, 2002). Nos données vont à l'encontre de cette hypothèse, puisque nous n'avons trouvé de relation ni avec le phosphore ni avec la Chl *a*, toutefois nous démontrons aussi qu'il y a une relation positive avec le DOC, qui est absente pour la communauté totale. De plus la variable qui explique la plus grande portion de la variation de l'abondance relative est le ratio entre le DOC et la Chl *a*,; l'abondance relative étant maximale dans les milieux où le DOC est élevé et la Chl *a* est faible. Ce patron inédit s'accorde avec les résultats de Eiler *et al.* (2009) qui démontrent une présence plus importante de gènes de synthèse de BChl *a* dans les milieux humique en comparaison avec ceux d'eau claire. Masin *et al.* (2008), avaient plutôt trouvé la tendance inverse dans les lacs tempérés européens; une abondance plus élevée dans les milieux à faible DOC. Or, nous suggérerons que ce soit la nature du DOC, plutôt que la quantité qui soit le facteur régulateur. Par exemple, dans les lacs dystrophiques, le carbone est souvent chimiquement et structurellement plus complexe et la présence de la voie métabolique phototrophique pourrait servir d'amorce énergétique pour la métabolisation de substrats

récalcitrants, tels les composés humiques, dans un procédé analogue à celui du cométabolisme (Farjalla *et al.*, 2009).

Dans cette étude nous nous sommes concentrés surtout sur les variable abiotiques ou environnementales comme potentiels régulateurs. Cependant il est possible que les AAPB soient soumis à un contrôle biotique tel que proposer par Sieracki *et al.*, (2006). Il est reconnu que l'intensité de la bactivorie dépend de la taille et de l'activité des cellules sous prédation (Gonzalez *et al.*, 1990; Bouvier et del Giorgio, 2007). Or ces deux facteurs prédisposent les AAPB à une prédation accrue; en plus de leur grande taille, ce groupe de bactéries est aussi potentiellement plus actif (Koblicek *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). Nos données supportent cette notion, puisque la variation à très courte échelle de la taille des AAPB est la signature non seulement d'un taux de croissance très élevé mais également d'un taux de mortalité très élevé. Ainsi il semble donc que les AAPB soient effectivement soumis à un contrôle important par la prédation, duquel elles peuvent toutefois potentiellement s'échapper sous certaines conditions, notamment comme nous l'avons remarqué dans le cas de l'abondance exceptionnelle de 37%.

Enfin, avec ce travail, nous avons l'occasion de contribuer à pallier au manque de données sur les AAPB en eaux douce, mais également à possiblement jeter une lumière nouvelle sur les modalités dans les patrons de distribution présentés dans la littérature. Mais ce travail souligne aussi certaine piste intéressante à poursuivre dans le future. Par exemple, étant donnée que beaucoup des études n'utilisent qu'une seule méthode d'identification des AAPB on ne sait que dans un seul cas (Waidner et Kirchman, 2007) que le potentiel exprimé soit représentatif de l'abondance réelle des AAPB, vérifier ici par l'intermédiaire de la PCR quantitative. Cette question serait, dans notre cas, très intéressante à évaluer sur les échantillons d'hiver. Mais ultimement une des question les plus pressante demeure celle de leur activité spécifique (taux de divisions et de prédation) car étant donnée leur taille impressionnante, ce groupe pourrait effectivement avoir un impact majeur non seulement sur les flux

de carbone et d'énergie mais également sur la contribution de la boucle microbienne au réseau trophique .

BIBLIOGRAPHIE

Allgaier, M., Uphoff, H., Felske, A., Wagner-Döbler, I. (2003) Aerobic Anoxygenic Photosynthesis in Roseobacter clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl Environ Microbiol* 69(9) : 5051-5059.

Beatty, J.T., (2002) On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria. *Photosynthesis Research* 73 : 109-114.

Béjà, O., Suzuki, M.T., Heidelberg, J.F., Preston, C.M., Hamada, T., Eisen, J.A. , Fraser, C.M. Delong, E.F. (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415 (6872): 630-633.

Biebl, H., Wagner-Döbler, I. (2006) Growth and bacteriochlorophyll *a* formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: influence of light regimen and starvation. *Process Biochemistry* 41: 2153-2159.

Bouvier, T., del Giorgio, P. A. (2007) Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environ Microbiol* 9: 287-297.

Breznak, J.A., Potrikus, C.J., Pfennig, N., Ensign, J.C. (1978) Viability and endogenous substrates used during starvation survival of *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology* 134(2) : 381-388.

Carignan, R., Planas, D., Vis, C. (2000) Planktonic production and respiration in oligotrophic Shield lakes. *Limnol Oceanogr* 45(1): 189-199.

Cottrell, M.T., Mannino, A., Kirchman, D.L. (2006) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the mid-atlantic bight and the north pacific gyre. *Appl Environ Microbiol* 72 (12): 557-564.

Cottrell, M.T., Kirchman, D.L. (2009) Photoheterotrophic microbes in the Arctic ocean in summer and Winter. *Appl Environ Microbiol* 75(15):4958-4966.

del Giorgio, P. A., Gasol, J. M., Vaquez, D., Mura, P., Agusti, S., Duarte, C. M. (1996) Bacterioplankton community structure: Protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnol Oceanogr* 41: 1169-1179.

Du H., Jiao, N., Hu, Y., Zeng, Y. (2006) Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology* 57(1): 92-105.

Eiler, A., (2006) Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean; implications and consequences. *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7431-7437.

Eiler, A., Beier, S., Sävström, C., Karlsson, J., Bertilsson, S. (2009) High ratio of bacteriochlorophyll biosynthesis to chlorophyll biosynthesis genes in bacteria of humic lakes. *Appl Environ Microbiol* 75: 7221-7228.

Farjalla, V.F., Amado, A.M., Suhett, A.L., Meirelles-Pereira, F. (2009) DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems. *Environ Sci Pollut Res* 16: 531-538.

Goericke, R. (2002) Bacteriochlorophyll *a* in the ocean: is anoxygenic bacterial photosynthesis important? *Limnol. Oceanogr.* 47(1): 290-295.

- Gonzalez, J. M., Sherr, E. B., Sherr, B. F. (1990) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl Environ Microbiol* 56:583–589.
- Hanada, S., Kawase, Y., Hiraishi, A., Takaichi, S., Matsuura, K., Shimada, K., Nagashima, K.V.P. (1997) *Porphyrobacter tepidarius* sp. No., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(2): 408-413.
- Harashima, K., Shiba, T., Totsuka, T. (1978) Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agricultural and biological Chemistry* 42(8) : 1627-1628.
- Hiraishi, A., Matsuzawa, Y., Kanbe, T., Wakao, N. (2000) *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. Nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1539-1546.
- Jiao, N., Zhang, Y., Zeng, Y., Hong, N., Liu, R., Chen, F., Wang, P. (2007) Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environmental Microbiology* 9(12): 3091-3099.
- Karr, E.A., Sattley, W.M., Jung, D.O., Madigan, M.T., Achenbach, L.A. (2003) Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic Lake. *Appl Environ Microbiol* 69: 4910-4914.
- Kolber, Z.S., VanDover, C.L., Niederman, R.A., Falkowski, P.G. (2000) Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* 407(6801) : 177-179.
- Kolber, Z.S., Plumley, F.G., Lang, A.S., Beatty, J.T., Blankenship, R.E., VanDover, C.L. *et al.* (2001) Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292(5526) : 2492-2495.
- Koblizek, M., Beja, O., Bidigare, R.R., Christensen, S., Beitez-Nelson, B., Vetriani, C., *et al.* (2003) Isolation and characterization of Erythrobacter sp. strains from the upper ocean. *Archives of Microbiology* 180(5) : 327-338.
- Koblizek, M., Ston-Egier, J., Sagan, S., Kolber, Z.S. (2005) Diel changes in bacteriochlorophyll *a* concentration suggest rapid bacterioplankton cycling in the Baltic Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 51(3): 353-361.
- Koblizek, M., Masin, M., Ras, J., Poulton, A.J., Prasil, O. (2007) Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean. *Environ Microbiol* 9(10): 2401-2406.
- Labrenz, M., Collins, M.D., Lawson, P.A., Tindall, B.J., Schumann, P., Hirsch, P. (1999) *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. Nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll *a* production from hypersaline Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol* 49: 137-147.
- Lami, R., Cottrell, M.T., Ras, J., Ulloa, O., Obernosterer, I., Claustre, H., Kirchman, D.L., Lebaron, P. (2007) High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 73(13): 4198-4205.
- Liu, R., Zhang, Y., Jiao, N. (2010) Diel variation in frequency of dividing cells and abundance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a coral reef system of the south China Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 58: 303-310.

- Masin, M., Zdun, A., Ston-Egiert, J., Nausch, M., Labrenz, M., Moulisova, V., Koblizek, M. (2006) Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 45(3): 224-254.
- Masin, M., Nodoma, J., Pechar, L., Koblizek, M. (2008) Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environ Microbiol* 10(8): 1988-1996.
- Michelou, V.K., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L. (2007) Light-stimulated bacterial production and amino acid assimilation by cyanobacteria and other microbes in the North Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 73(17): 5539-5546.
- Moran, M.A., Miller, W.L. (2007) Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nature Reviews Microbiology* 5(10): 792-800.
- Nishimura, K., Shimada, Ohta, H., Masuda, T., Shio, Y., Takamiya, K.-I. (1996) Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*. *Plant and Cell Physiology* 37(2): 153-159.
- Okamura, M.Y., Feher, G. (1986) Isotope effect on electron transfer in reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(21): 8152-8156.
- Oz, A., Sabehi, G., Koblizek, M., Massana, R., Bèjà, O. (2005) Roseobacter-like bacteria in Red and Mediterranean Sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations. *Appl Environ Microbiol* 71(1): 344-353.
- Page, K.A., Connon, S.A., Giovannoni, S.J. (2004) Representative freshwater isolated from Crater Lake, Oregon. *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6542-6550.
- Rathgeber, C., Beatty, J.T., Yurkov, V. (2004) Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group. *Photosynthesis Research* 81: 113-128.
- Salka, I., Moulisova, V., Koblizek, M., Jost, G., Jürgens, K., Labrenz, M. (2008) Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic sea. *Appl Environ Microbiol* 74(14): 4398-4404.
- Schwalbach, M.S., Fuhrman, J.A. (2005) Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnol. Oceanogr.* 50(2): 620-628.
- Shiba, T., Simidu, U., Taga, N. (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Appl Environ Microbiol* 38(1): 43-45.
- Sieracki, M.E., Gilg, I.C., Thier, E.C., Poulton, N.J., Goericke, R. (2006) Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 51(1): 38-46.

Suyama, T., Shigematsu, T., Suzuki, T., Tokiwa, Y., Kanagawa, T., Nagashima, K.V.P., Hanada, S. (2002) Photosynthetic apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A is transcriptionally induced by carbon limitation. Appl Environ Microbiol 68(4): 1665-1673.

Waidner, L.A., Kirchman, D.L. (2005) Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. Appl Environ Microbiol 71(10): 5908-5919.

Waidner, L.A., Kirchman, D.L. (2007) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake Estuaries. Appl Environ Microbiol 73(2): 3936-3944.

Waidner, L., Kirchman, D.L. (2008) Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene *pufM* in the Delaware estuary. Appl Environ Microbiol 74(13): 4012-4021.

Yurkov, V.V. (2006) Aerobic phototrophic proteobacteria. The Prokaryotes, Volume 2. 3rd edn by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. Springer-Verlag, New-York, pp 562-584.

Yurkov, V.V., Beatty, J.T. (1998) Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3) : 695-724.

Yurkova, N., Rathgeber, C., Swiderski, J., Stackbrandt, W., Beatty, J.T., Hall, K. J., Yurkov, V. (2002) Diversity, distribution and physiology of the aerobic phototrophic bacteria in the mixolimnion of a meromictic lake. FEMS Microbiology Ecology 40(3): 191-204.

Yutin, N., M.T. Suzuki, O. Béjà, 2005. Novel Primers Reveal Wider Diversity among Marine Aerobic Anoxygenic Phototrophs. Appl Environ Microbiol 71(12): 8958-8962.

Yutin, N., Suzuki, M.T., Teeling, H., Weber, M., Venter, J.C., Rusch, D.B., Béjà, O. (2007) Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. Environ Microbiol 9(6): 1464-1475.

Zhang, Y., Jiao, N. (2007) Dynamics of aerobic anoxygenic heterotrophic bacteria in the East China Sea. FEMS Microbiology Ecology 61(3): 459-469.